

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Ústav pro životní prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí

Nové zpomalovače hoření v životním prostředí

New flame retardants in the environment

Diplomová práce

Martin Ezechiáš



Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha 2011

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně s využitím uvedené literatury a informací, na něž odkazuji. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré (i přejaté informace) budou řádně citovány. Rovněž prohlašuji, že předložená diplomová práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

.....

Chtěl bych na tomto místě poděkovat především svému školiteli Doc. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D. za umožnění této diplomové práce a za její vedení. Dále bych chtěl poděkovat celému týmu z Laboratoře environmentální biotechnologie, MBÚ AV za pomoc slovem i činem. Jmenovitě pak Aleně Filipové, Zdeně Křesinové, Martině Plačkové a Milanu Muzikáři. V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat svojí rodině za to, že mě podporovala psychicky i materiálně a umožnila mi tak nerušenou práci na této diplomové práci.

Martin Ezechiáš

Obsah

Seznam použitých zkratk	1
Abstrakt	4
Abstract	5
Úvod	6
1. Literární rešerše	7
1.1. Historie používání zpomalovačů hoření	7
1.2. Bromované zpomalovače hoření	8
1.2.1. Bromované zpomalovače hoření	8
1.2.2. Legislativa BFR v Evropské unii	8
1.2.3. „Nové“ bromované zpomalovače hoření	9
1.2.3.1. Tetrabrombisfenol A (TBBPA)	10
1.2.3.2. 1,2-bis(2,4,6-tribromfenoxy)ethan (BTBPE)	12
1.2.3.3. Dekabromdifenylethan (DBDPE)	14
1.2.3.4. Bis(2-ethylhexyl) tetrabromftalát (TBPH)	15
1.2.3.5. Anhydrid kyseliny tetrabromftalové (TBPA)	16
1.2.3.6. 2,3,4,5,6-pentabromethylbenzen (PBEB)	17
1.2.3.7. 2,3,4,5,6-pentabromtoluen (PBT)	19
1.2.3.8. Hexabrombenzen (HBB)	20
1.2.3.9. 2-allyloxy-1,3,5-tribrombenzen (ATBB)	22
1.2.3.10. Pentabrombenzyl akrylát (PBBA)	23
1.2.3.11. 2,4,6-tribromfenol (TBP)	23
1.2.3.12. Dekabrombifenyl (DBB)	26
1.2.3.13. Tetrabrombisfenol A bis(dibrompropyl ether) (TBBPA-DBPE)	27
1.3. Ligninolytické houby a jejich potenciál k degradaci organických polutantů	28
2. Cíle práce	30

3. Materiály a metody	31
3.1. Přehled experimentu	31
3.1.1. Hormonální aktivity nových bromovaných zpomalovačů hoření	31
3.1.1.1. β -galaktázový test	31
3.1.1.2. Bioluminescentní estrogení a androgení test	31
3.1.2. Biodegradační experiment	31
3.1.3. Zavedení analytické metody pro vybrané BFR	32
3.2. Chemikálie a použité mikroorganismy	32
3.3. Přístrojové vybavení	33
3.4. Použité metody	33
3.4.1. Kvasinkové testy	33
3.4.2. Biodegradační test	37
3.4.3. Metoda derivatizace látky 2,4,6-tribromfenol	38
3.4.4. Zpracování dat	39
3.4.4.1. Zpracování dat u β -galaktázového testu	39
3.4.4.2. Zpracování dat z bioluminescentního testu	39
3.4.4.3. Zpracování dat z degradačního pokusu	40
3.4.4.4. Zpracování dat pro statistické vyhodnocení	40
3.4.4.5. Zpracování dat z plynové chromatografie s hmotnostním detektorem	41
4. Výsledky	42
4.1. Rozpustnost zkoumaných látek	42
4.2. Toxické působení přidávaných chemikálií na kvasinky	42
4.3. Estrogení a androgení aktivity jednotlivých zpomalovačů hoření	42
4.4. Biodegradační pokus s ligninolytickými houbami	44
4.5. Optimalizace metody analýzy pro nové BFR	45
4.5.1. Derivatizace látky 2,4,6-tribromfenol	45

4.5.2. Metoda analýzy nových bromovaných zpomalovačů hoření na plynové chromatografii	45
5. Diskuze	48
5.1. Hormonální aktivity zkoumaných látek	48
5.2. Biodegradační pokus	49
5.3. Optimalizace analytické metody	51
6. Závěr	52
Přílohy	53
Použitá literatura	72

Seznam použitých zkratek

A	Absorbance
ABS	Akrylonitril-butadien styren, z anglického Acrylonitrile butadiene styrene
AR	Androgenní receptor, anglicky androgen receptor
ATBB	2-allyloxy-1,3,5-tribrombenzen, z anglického 2-allyloxy-1,3,5-tribromobenzene, Správný český název: 1,3,5-tribrom-2-(2-propylen-1-yloxy)benzen CAS: 3278-89-5
B. ADUS	<i>Bjerkandera Adusta</i>
BAF	Bioakumulační faktor, spočítá se jako koncentrace v organismu / koncentrace v prostředí ve kterém se nachází
BB-209	Dekabrombifenylyl CAS: 13654-09-6
BDE-100	3,3',4,4',6-pentabromdifenylyl ether CAS: 189084-64-8
BDE-153	2,2',4,4',5,5'-hexabromdifenylyl ether CAS: 68631-49-2
BDE-154	2,2',4,4',5,6'-hexabromdifenylyl ether CAS: 207122-15-4
BDE-209	Dekabromdifenylyl ether CAS: 1163-19-5
BDE-47	2,2',4,4'-tetrabromdifenylyl ether CAS: 5436-43-1
BDE-99	3,3',4,4',5-pentabromdifenylyl ether CAS: 60348-60-9
BFR	Bromované zpomalovače hoření, z anglického Brominated flame retardants
BMF	Biomagnifikační faktor, koncentrace v organismu/koncentrace v potravě
BSTFA	N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamid
BTBPE	1,2-bis(2,4,6-tribromfenoxy)ethan, z anglického 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane CAS: 37853-59-1
CALUX	Biotest na testování (anti)estrogeních a (anti)androgeních aktivit chemikálií, z anglického Chemical Activated Luciferase gene eXpression
CAS	Zavedené číselné označení chemické látky, z anglického Chemical Abstracts Service
CF	Korekční faktor, zavedené v článku Leskinen et al., 2005
CPRG	Chlorfenol red-β-D-galaktopyranosidáza, z anglického chlorophenol Red-β-D-galactopyranoside CAS: 99792-79-7
CYP17	Enzym ze skupiny cytochromů P450
CYP19	Enzym aromatáza, anglicky aromatase, klíčový enzym k biosyntéze estrogenů
ČOV	Čistírna odpadních vod
D. SQUA	<i>Dichomitus squalens</i>
DBB	Dekabrombifenylyl, z anglického decabromobiphenyl CAS: 13654-09-6
DBDPE	Dekabromdifenylylethan, z anglického decabromodiphenylethane CAS: 84852-53-9
Deka-BDE	Komerční směs bromovaných difenylyletherů, převážně zastoupení BDE-209
DMSO	Dimethylsulfoxid, anglicky dimethyl sulfoxide

DPTE	2,3-dibrompropyl-2,4,6-tribromfenyl ether CAS: 35109-60-5
E2	17 β -estradiol CAS: 50-28-2
EPS	Expandovaný polystyrén, z anglického Expanded polystyrene
ER	Estrogenní receptor, anglicky estrogen receptor
EtAc	Ethylacetát, anglicky ethylacetate CAS: 141-78-6
FI	Fold induction, zavedené v článku Leskinen et al., 2005
FI _{corrected}	Výsledná opravená hodnota FI, zavedené v článku Leskinen et al., 2005
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HBB	Hexabrombenzen, z anglického hexabromobenzene CAS: 87-82-1
HBCD	Hexabromcyklododekan, z anglického hexabromocyclododecane CAS: 25637-99-4
HIPS	Houževnatý polystyrén, z anglického high-impact polystyrene
Hz	Hertz, jednotka frekvence
I. LACT	<i>Irpex lacteus</i>
IC ₂₀	Inhibiční koncentrace 20, Koncentrace, při které je inhibováno 20% biologického nebo biochemického procesu
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace 50, Koncentrace, při které je inhibováno 50% biologického nebo biochemického procesu
K _{oc}	Rozdělovací koeficient mezi organický uhlík a vodu
LC ₅₀	Letální koncentrace 50, Koncentrace, při které umře 50% jedinců ze zkoumaného výběru
LD ₅₀	Letální dávka 50, Dávka, při které umře 50% jedinců ze zkoumaného výběru
Log K _{oc}	Dekadický logaritmus K _{oc}
log P _{ow}	Dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu n-oktanol, voda. Jde o poměr rovnovážných koncentrací testované látky v systému s dvěmi kapalinami n-oktanol a voda
N/A	Značka pro chybějící údaj
NOAEL	Z anglického No observed adverse effect level, Dávka nebo expoziční koncentrace látky, při které není pozorován žádný statisticky významný nepříznivý účinek na organismus v porovnání s kontrolní skupinou
OECD	Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj, z anglického Organisation for Economic Co-operation and Development
Okta-BB	Komerční směs bromovaných bifenylů
Okta-BDE	Komerční směs bromovaných difenyletherů
OSPAR	Konvence na ochranu severního atlantiku, z anglického Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic
P. CHRYS	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
P. OST	<i>Pleurotus ostreatus</i>
P.A.	Jakostní třída čistoty chemikálií, pro analýzu
P450	Cytochrom P450, enzym schopný transformovat xenobiotika v tělech organismů

PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PBBA	Pentabrombenzyl akrylát, z anglického pentabrombenzyl acrylate, správný český název: (2,3,4,5,6-pentabromfenyl)methyl-propeonát CAS: 59447-55-1
PBDE	Polybromované difenylethery, z anglického polybrominated diphenyl ethers
PBEB	2,3,4,5,6-pentabromethylbenzen, z anglického 2,3,4,5,6-pentabromoethylbenzene CAS: 85-22-3
PBT	2,3,4,5,6-pentabromtoluen, z anglického 2,3,4,5,6-pentabromotoluene CAS: 87-83-2
Penta-BDE	Komerční směs bromovaných difenyletherů
POP	Persistentní organické polutanty, z anglického persistent organic pollutants
PR	Progesteronový receptor, anglicky progesterone receptor
PVC	Polyvinylchlorid, z anglického Polyvinyl chloride
REACH	Direktiva Evropské unie EU 1907/2006, z anglického Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals
RLU	Integrované hodnoty z luminometru, z anglického relative light unit
RoHS	Direktiva Evropské unie 2002/95/EC, z anglického Restriction of Hazardous Substances
rpm	Jednotka frekvence otáček, z anglického revolutions per minute.
SETUL	<i>Setulipes androsaceus</i>
T. VER	<i>Trametes Versicolor</i>
T4	Thyroxin, z anglického thyroxine nebo též 3,5,3',5'-tetraiodothyronine CAS: 51-48-9
TBB	2-ethylhexyl 2,3,4,5-tetrabrombenzoát, z anglického 2-ethylhexyl 2,3,4,5-tetrabromobenzoate CAS: 183658-27-7
TBBPA	Tetrabrombisfenol A, z anglického tetrabromobisphenol A CAS: 79-94-7
TBBPA-DBPE	Tetrabrombisfenol A bis(dibromopropyl ether), z anglického tetrabromobisphenol A bis(dibromopropyl ether), správný český název 2,2-bis[(3,5-dibrom-4-(2,3-dibrompropoxy)fenyl]propan CAS: 21850-44-2
TBP	2,4,6-tribromfenol, z anglického 2,4,6-tribromophenol CAS: 118-79-6
TBPA	Anhydrid kyseliny tetrabromftalové, z anglického tetrabromophthalic anhydride CAS: 632-79-1
TBPH	Bis(2-ethylhexyl) tetrabromftalát, z anglického bis(2-ethylhexyl)tetrabromophthalate CAS: 26040-51-7
TMCS	Trimethylchlorosilan CAS: 75-77-4
TTR	Transthyretin, transportní protein pro T4 v séru
USA	Spojené státy americké
WEEE	Direktiva evropské unie 2002/96/EC, z anglického Waste Electrical and Electronic Equipment
WHO	Světová zdravotnická organizace, z anglického World Health Organization

Abstrakt

V posledních letech se mnoho vědeckých článků věnuje problematice endokrinně aktivních látek v životním prostředí. Některé z těchto látek jsou zařazovány do skupiny bromovaných zpomalovačů hoření. Nicméně jen málo článků se zabývá endokrinní aktivitou některých „nových“ bromovaných zpomalovačů hoření. Tyto látky jako například 1,2-bis(2,4,6-tribromfenoxy)ethane (BTBPE) nebo bis(2-ethylhexyl) tetrabromftalát (TBPH) jsou používány z důvodu zákazu některých nejvíce produkovaných směsí bromovaných zpomalovačů. V této práci byly použity dva rekombinantní kvasinkové testy na měření estrogenních, androgenních, antiestrogenních a antiandrogenních aktivit některých alternativních bromovaných zpomalovačů hoření. Byly také použity ligninolytické houby na zjištění biodegradace těchto látek. Naše výsledky naznačují, že látka 2,4,6-tribromfenol (TBP) může být nových endokrinním disruptorem v životním prostředí. Tato sloučenina měla v použitém testu antiestrogenní a antiandrogenní účinky. 1,2-bis(2,4,6-tribromfenoxy)ethane (BTBPE) také vykázal jistou antagonistickou aktivitu. Pouze tři látky v biodegradčním experimentu měly signifikantní úbytek během sledovaného období. Pro ostatní látky nebyla pozorována žádná biodegradace. V této práci bylo použito plynové chromatografie s hmotnostní detekcí na analýzu těchto „nových“ zpomalovačů hoření. Metody pro plynovou chromatografii a derivatizaci látky TBP jsou rovněž ukázány.

Klíčová slova: Bromované zpomalovače hoření, endokrinní disruptory, kvasinkové biotesty, ligninolytické houby, 2,4,6-tribromfenol, derivatizace

Abstract

In the recent years, many research articles focused on endocrine disrupting compounds in the environment. Some of these compounds are listed in a group named brominated flame retardants. However, only few articles investigated endocrine activity of several „new“ brominated flame retardants. These chemicals such as 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane (BTBPE) or bis(2-ethylhexyl) tetrabromophthalate (TBPH) are newly used due to ban of some previously most produced brominated flame retardant mixes. In this study, we used two recombinant yeast screens to measure estrogenic, androgenic, antiestrogenic and antiandrogenic activities of some alternative brominated flame retardants. We also used ligninolytic fungi to investigate biodegradation of these compounds. Our results suggest, that 2,4,6-tribromophenol (TBP) may be a new environmental endocrine disruptor. This substance showed antiestrogenic and antiandrogenic activity in our tests. 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane (BTBPE) had certain antagonistic activity too. In the biodegradation experiment, only three compounds showed significant degradation during the test period. No biodegradation have been observed for other compounds. In this study, we applied gas chromatography with mass spectrometry to analyze these „new“ flame retardants. Method for gas chromatography and derivatization of TBP have been developed and documented.

Keywords: Brominated flame retardants; endocrine disruptors; yeast reporter gene assays; ligninolytic fungi; 2,4,6-tribromophenol; derivatization

Úvod

V posledních letech se řada vědeckých výzkumů zabývá problematikou organických polutantů v životním prostředí a jejich možnými negativními účinky na lidské zdraví. Velká pozornost je věnována látkám poškozující endokrinní systém člověka i volně žijících živočichů (tzv. endokrinní disruptory). Chemické látky s endokrinními účinky se běžně v literatuře klasifikují do 10 skupin: polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované organické látky, pesticidy, ftaláty, organické rozpouštědla, bisfenol A, alkylfenolické sloučeniny, bromované zpomalovače hoření, kovy a ostatní. Většinu těchto skupin lze dále dělit na několik podskupin (Brouwers et al., 2009). Jednou z těchto skupin jsou zmíněné bromované zpomalovače hoření, které jsou běžně známy pod zkratkou BFR. Tato zkratka vznikla z anglického názvu Brominated flame retardants. Tyto látky se používají jako aditiva do různých produktů běžně užívaných v domácnostech (elektronika, čalounění, nábytek, bytový textil, tepelné izolace atd.). BFR nacházejí také značné uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu, především ve zpracování plastů a umělých hmot. Tyto látky jsou prakticky nehořlavé a právě jejich nehořlavost a schopnost zhaset plamen dala podnět k jejich rozsáhlému používání. Tato jejich schopnost spočívá v tom, že dokáží uvolňovat bromidový iont, který zhasí a zpomaluje oxidativní proces hoření.

BFR je velmi různorodá skupina co do jednotlivých látek. Hlavní pozornost vědeckého výzkumu zaujímaly látky tetrabrombisfenol A (TBBPA), hexabromcyklododekan (HBCD) a polybromované difenylethery (PBDE). Důvody k této pozornosti, byly především jejich zvýšené koncentrace v životním prostředí, persistence, toxické působení na živočichy i člověka, schopnost dálkového transportu, vstupování do potravního řetězce a hlavně velmi rozšířené používání.

Jelikož byly zjištěny negativní dopady těchto látek na životní prostředí a lidské zdraví, některé z nich byly legislativně zakázány. Některé jsou dokonce zařazeny na seznam persistentních organických polutantů (POP) podle Stockholmské konvence. Tyto restriktce převádí v současné době pozornost na jiné látky dříve méně vyráběné nebo zcela nové. Téměř úplný výčet těchto látek uvádí zpráva Environmental Health Criteria 192 (WHO, 1997). O těchto nových a alternativních zpomalovačích hoření je známo jen velmi málo, a tak je třeba výzkumu, jejich možných negativních účinků, dříve než se začnou používat v masovém měřítku.

Tato diplomová práce se věnuje problematice „nových“ bromovaných zpomalovačů hoření, které nejsou legislativně zakázány a které v současné době vyžadují naši pozornost.

1. Literární rešerše

1.1. Historie používání zpomalovačů hoření

Látky k omezení nebo zamezení hoření se používaly už od starověku. Již Egypťané používali kamenec ke snížení hořlavosti dřeva. Také Římané používali směs kamence a octa na ošetření dřeva. Kamenec z chemického hlediska je podvojná sůl kyseliny sírové. Používání kamence je rovněž známo i z 18. století v Británii, kde pan Wyld používá k ošetření dřeva a textilu směs kamence, síranu železnatého a boraxu. V této době se rovněž používá kamenec ke snížení hořlavosti balónů. Na začátku 20. století bylo popsáno ošetření bavlny s cílem zpomalit hoření, za použití směsi cíničitanu sodného a síranu amonného.

Během 20. století došlo k velkému rozvoji nových látek na zpomalování hoření a vytvořila se pestrá skupina anorganických a organických sloučenin. Dle způsobu použití se začaly rozdělovat na reaktivní a nereaktivní retardéry. Reaktivní organické zpomalovače, jakými byly například vinylchlorid, vinylidenchlorid a 2,4,6 – tribromfenylakrylát, se přidávaly do výchozí reakční směsi při výrobě polymeru a stávaly se jeho trvalou součástí. Důležitější však byly nereaktivní anorganické a organické zpomalovače, jako například halogenované a organofosfátové sloučeniny, oxid antimonitý, hydratovaný oxid hlinitý, které se přidávaly k makromolekulárním přírodním i syntetickým látkám dodatečně. Mezi technicky a ekonomicky nejvýznamnější aditiva snižující hořlavost patřil trihydrát oxidu hlinitého, který se vyráběl z bauxitu.

Během dalšího výzkumu bylo zjištěno, že lepší schopnost zpomalovat hoření a také stálost v materiálu mají halogenované zpomalovače, a proto se začaly více používat látky, jako například chlorid hlinitý nebo bromid hlinitý. Bromované zpomalovače se ukázaly být účinnějšími, a tak se začaly více používat.

Posléze s masivním rozvojem organické chemie se začaly používat organické bromované zpomalovače hoření, a z nich nejvíce právě bromované difenylethery a tetrabrombisfenol A. Bromované difenylethery se vyrábějí ve třech úrovních bromace deka-BDE, okta-BDE a penta-BDE. Dekabromdifenylether (BDE-209) je směs skládající se z 97-98% dekabromdifenyletheru (BDE-209). Okta-BDE tvoří směs ze 85% BDE-153 a ze 14% BDE-154. Penta-BDE je nejvíce různorodou směsí, která se skládá ze 31% BDE-47, ze 48% BDE-99, ze 8.8% BDE-100, ze 6.6% BDE-153 a ze 4.4% BDE-154 (Fisk et al., 2003). Procenta se mohou lišit v závislosti na dodavateli.

V devadesátých letech bylo na trhu přes 100 látek na zpomalování hoření s celkovou poptávkou 600 000 tun za rok (OECD, 1995).. Tyto látky můžeme rozdělit na anorganické,

bromované organické, chlorované organické, organofosforečnanové, halogenované organofosforečnanové a zpomalovače na bázi dusíku (Fisk et al., 2003). Bromované zpomalovače představují 25% celosvětové poptávky po zpomalovačích hoření. Zhruba 30 bromovaných látek pak představuje většinu komerčně používaných BFR (OECD, 1995).

Nutno podotknout, že se postupem času také zvyšovala poptávka po látkách zpomalující hoření. Pro představu je uveden vývoj spotřeby v Japonsku během let 1986 až 1994 v tabulce 1 v přílohách. V této tabulce je patrný trend zvyšování poptávky a tudíž i produkce. Odhaduje se, že světová produkce bromovaných zpomalovačů hoření byla v roce 1992 150000 tun, z toho 33% připadá na tetrabrombisfenol A a 27% na polybromované difenylethery (OECD, 1995). Spotřeba BFR i v dalších letech stoupala až k hodnotě 203790 tun v roce 2001. Zastoupení jednotlivých látek a regionů spotřeby udává tabulka 2 (Law et al., 2006b).

1.2. Bromované zpomalovače hoření

1.2.1. Bromované zpomalovače hoření

Bromované zpomalovače hoření (BFR) je už vžitě označení pro organické látky obsahující brom a užívající se jakožto aditiva pro zpomalování hoření. Jelikož co do objemu produkce jsou nejvíce podstatné tetrabrombisfenol A, hexabromcyklododekan a polybromované difenylethery, zahrnují někteří autoři do BFR pouze tyto látky. To však není úplně přesné, protože v současné době existuje celá řada bromovaných látek používaných na zpomalení hoření.

Existuje mnoho vědeckých prací zabývajících se výše zmíněnými látkami, jejich přítomností v životním prostředí (Hale et al., 2006; Law et al., 2006b; de Wit et al., 2006), jejich biologickým rozkladem (He et al., 2006; Davis et al., 2006; Gerecke et al., 2006; Voordeckers et al., 2002), jejich akumulací v těle člověka (Sjodin et al., 2003; Hites, 2004; Inoue et al., 2006) a jejich toxickými účinky (Viberg et al., 2004; Zhou et al., 2001; Birnbaum et al., 2004). Těmito látkami se souhrnně zabývám ve své bakalářské práci (Ezechiáš, 2009).

1.2.2. Legislativa BFR v Evropské unii

Jelikož některé bromované zpomalovače hoření byly shledány jakožto látky toxické a persistentní, byly učiněny legislativní kroky k jejich zákazu. V Evropské unii bylo dokončeno hodnocení rizik pro penta- a oktabromované difenylethery podle direktivy REACH

(Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals; direktiva č. 1907/2006). Následně byl dohodnut celoevropský zákaz jejich prodeje a používání. Nařízením 2003/11/ES je zakázáno obchodování a používání penta-BDE a okta-BDE v koncentracích vyšších než 0,1% hmotnosti výrobku od roku 2004. Výrobky obsahující více jak 0,25% penta-BDE jsou označeny za nebezpečný odpad. V rámci směrnice o odpadech z elektrických a elektronických zařízení (2002/96/ES - také známa jako WEEE) a směrnice o omezení nebezpečných látek v těchto produktech (2002/95/ES - známa jako RoHS) byla dosažena dohoda o ukončení používání polybromovaných difenyletherů v elektrických a elektronických zařízeních do 1. 7. 2006. Tato směrnice byla transponována do české legislativy zákonem č. 7/2005 Sb., kterým se mění zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně dalších zákonů. Směrnice 2002/95/ES byla ještě upravena rozhodnutím komise 2005/717/ES, která ze zákazu používání vyjímá deka-BDE.

V roce 2009 byly některé BFR také zařazeny na seznam persistentních organických polutantů (POP) podle Stockholmské konvence. Tyto restrikce se týkají komerčních směsí penta-BDE a okta-BDE (rozhodnutí SC-4/18 a SC-4/14). Obě tyto směsi byly zařazeny do přílohy A, tedy látek, u kterých je zakázáno používání, výroba, dovoz i vývoz. Ve stejném seznamu je také jiný zpomalovač hoření hexabrombifenyl a známější organické polutanty jako například polychlorované bifenyly, hexachlorbenzen, toxafen a další. V současné době je návrh na zařazení hexabromcyklododekanu rovněž do přílohy A, nicméně ještě o tomto návrhu nebylo rozhodnuto.

1.2.3. „Nové“ bromované zpomalovače hoření

Po legislativním zákazu některých nejvíce produkovaných BFR se začaly objevovat nové a alternativní zpomalovače hoření. Jsou to látky buď zcela nově objevené, nebo jen více používané v posledních letech. V literatuře se pro tyto látky vžil název Nové bromované zpomalovače hoření a označuje ty látky, které nepatří mezi nejvíce známé a používané (tetrabrombisfenol A, hexabromcyklododekan a polybromované difenylethery).

V následujících podkapitolách bude uveden seznam látek, které se v současné době volně používají jako zpomalovače hoření. Do tohoto seznamu nejsou zahrnuty polybromované difenylethery a hexabromcyklododekan kvůli schváleným nebo připravovaným legislativním restrikcím. Také zde není možné sepsat úplný výčet BFR z důvodu rozsahu, a tak je tento seznam omezen na látky, které jsou dále zmiňovány v experimentální části.

1.2.3.1. Tetrabrombisfenol A (TBBPA)

Tetrabrombisfenol A je v současné době nejvíce používaným BFR, a tak se běžně nezahrnuje mezi „nové“ bromované zpomalovače hoření. Prodává se jako bílý krystalický prášek s teplotou tání 181 °C. Rozpustnost ve vodě je 4,16 mg/l při 25 °C a Log P_{ow} je 4,5 (Haneke, 2002a). Vyrábí se bromací molekuly bisfenolu A a prodává se pod různými obchodními názvy jako například SAYTEX® RB-100 nebo Firemaster BP4A. TBBPA je používán hlavně jako reaktivní zpomalovač hoření v epoxydovaných pryskyřicích a také do skříní nejrůznější elektroniky. Při výrobě epoxydovaných pryskyřic je TBBPA přidáván až po vytvrzení, což by nemělo přinášet žádný volný TBBPA ve výsledném produktu. Přesto se zjistilo, že vyrobené tištěné spoje obsahují i volný TBBPA a to v poměru 4 µg na gram přidaného TBBPA (Sellstrom a Jansson, 1995). Kromě jeho použití v polymerech, se také používá jako zpomalovač hoření plastů, papíru a textilií, jako změkčovaadlo v lepidlech a povlaků, a jako chemický meziprodukt pro syntézu dalších zpomalovačů hoření jako například TBBPA allyl ether, TBBPA bis(2-hydroxyethyl ether) a další. Kromě toho bývá TBBPA aplikován na koberce a kancelářský nábytek (Haneke, 2002a).

TBBPA se dostává do životního prostředí spolu s odpadní vodou z výroben počítačových skříní a tištěných spojů. Také se uvolňuje z výrobků a navázán na aerosolové částice je součástí vnitřního prostředí (Haneke, 2002a). Ve vodách se TBBPA adsorbuje na pevné částice a kumuluje v sedimentu, což je dáno rozdělovací konstantou $K_{oc} = 56000$. Těkání z volné hladiny je velmi málo pravděpodobné. V ovzduší je TBBPA pouze na aerosolových částicích díky nízké tenzi par ($1,8 \times 10^{-11}$ mm Hg při 25 °C), a proto je z ovzduší odstraňován hlavně mokrou nebo suchou depozicí (Haneke, 2002a). V půdě je velmi málo mobilní a také těkání z povrchu je jen velmi malé kvůli nízké Henryho konstantě. Všechny tyto fyzikálně chemické charakteristiky předurčují TBBPA ke kumulaci v půdě a sedimentu, kde byl také stanovován různými studiemi (Harrad et al., 2009, Sellstrom a Jansson, 1995, Watanabe et al., 1983). Rovněž se vyskytuje v kalech čističek odpadních vod (de Wit et al., 2002).

Studie ukazují poměrně rychlou biodegradaci TBBPA, který se v anaerobních podmínkách dehalogenuje až na bisfenol A. Většina této látky byla takto degradována už během 10 dní (Ronen a Abeliovich, 2000) nebo během 40 dní (Voordeckers et al., 2002). Vzniklý bisfenol A je možné dále rozkládat v aerobních podmínkách (Ronen a Abeliovich, 2000). Rovněž byla zkoumána degradace ligninolytickými houbami. Houba *Trametes versicolor* degradovala většinu TBBPA už po 4 dnech trvání pokusu (Uhnáková et al., 2009). V sedimentu byly rovněž nalezeny methylované TBBPA, což by mohlo být způsobeno taktéž

mikrobiální transformací. Několik studií potvrdilo, že různé bakterie, například *Rhodococcus* sp. kmen 1395 nebo *Mycobacterium* kmen CG-2 a PCP-1, jsou schopny methylace TBBPA za aerobních podmínek. Výsledný produkt je vysoce lipofilní, což přináší vyšší bioakumulaci než původní TBBPA (George a Häggblom, 2008). Podstatné je, že TBBPA nepodléhá degradaci během procesu úpravy vod v ČOV (WHO, 1995). Byla rovněž pozorována fotodegradace této látky při vystavení UV záření za vzniku produktů jako dibromfenol a 2,4,6-tribromfenol (de Wit, 2002). Byla prováděna i fotodegradace TBBPA UV zářením ve vodě, která má následující poločasy rozkladu: 10,2 dnů na jaře, 6,6 v létě, 25,9 na podzim a 80,7 dnů v zimě. Vše je samozřejmě výrazně ovlivněno aktuální oblačností (WHO, 1995).

TBBPA rovněž vstupuje do potravního řetězce. Studie ukazují různé hodnoty biokoncentračního faktoru v rozmezí od 20 do 3200. Vše záleží na experimentálních podmínkách a použitém organismu (WHO, 1995). Zajímavé je, že TBBPA nebyl detekován ve vzorcích ryb ani v mušli *Mytilus edulis* v Japonsku (WHO, 1995). Byl však stanovován například v tkáních ptáků v rozsahu 28 až 173 ng/g (He et al., 2010). Obecně lze říct, že TBBPA je detekován v tělech volně žijících živočichů jen výjimečně. Toto může být způsobeno sice zvýšeným příjmem TBBPA mořskými organismy, ale také rychlou biotransformací a exkrecí (WHO, 1995).

Toxické působení TBBPA je vždy třeba rozlišit na akutní a chronickou expozici. Při jednorázovém orálním podání byly u testů prováděných na myších a laboratorních potkanech zjištěny smrtelné dávky LD₅₀ na 3,2 g/kg a 2 g/kg. Jiná studie zase stanovila, že LD₅₀ je větší než 5 g/kg (WHO, 1995). Rovněž i jiný způsob podání TBBPA jako dermální nebo inhalační nevyvolal žádnou výraznější akutní toxickou odpověď (WHO, 1995). Také nebyl pozorován žádný teratogenní účinek u laboratorních potkanů. Byly prováděny i testy na mutagenitu u *Salmonella typhimurium* kmeny TA1535, TA1537, TA1538, TA98 a TA100 a také u *Saccharomyces cerevisiae* kmen D4. Nebyl zaznamenán žádný pozitivní výsledek pro mutagenní aktivitu u všech testovaných koncentrací (WHO, 1995).

Studie zkoumající androgenní působení TBBPA zjistila pouze slabý antiandrogenní efekt u vyšších koncentrací (Christen et al., 2010). Velmi podstatná u toxického působení tohoto zpomalovače je jeho schopnost napodobovat thyroïdní hormon. Byla prokázána vazba na thyroïdní receptor alfa i beta v testech *in vitro*. Rovněž byl pozorován aditivní efekt TBBPA k přirozeným hormonům (Shiizaki et al., 2010). Studie zkoumající celou generaci laboratorních potkanů vystavovaných různým dávkám TBBPA prokázala jako hlavní efekt snížení koncentrací thyroxinu (T4) a zvětšení váhy varlat a hypofýzy u samečů. Nižší koncentrace thyroxinu v krvi souvisí se změnou vývojových parametrů včetně odloženého

sexuálního vývoje samic a snížení úmrtnosti mláďat (Van der Ven et al., 2008). Jiná *in vitro* studie zase prokázala silnou inhibici progesteronového receptoru s $IC_{20} = 7,8 \times 10^{-8}$ mol/l (Li et al., 2010)

I přes prokázané toxické účinky TBBPA je tento zpomalovač stále volně používán v chemickém průmyslu. Evropská unie uzavřela hodnocení rizik TBBPA pro lidské zdraví v roce 2005 s konstatováním žádných rizik spojených s touto látkou. O dva roky později (2007) bylo uzavřeno i hodnocení environmentálních rizik. Evropská komise pouze doporučuje vybrané oblasti sledovat a shromažďovat další údaje, ale na základě dostupných informací nebylo zjištěno žádné riziko (Official Journal of the European Union 2008/C 152/02).

1.2.3.2. 1,2-bis(2,4,6-tribromfenoxy)ethan (BTBPE)

Tento zpomalovač hoření je jedním z nově používaných a předpokládá se, že na trhu nahrazuje zakázaný okta-BDE. Je vyráběn reakcí 1,2-dibromethanu s 2,4,6-tribromfenolátu a používá se jako aditivní zpomalovač hoření do akrylonitril-butadien styrénu (ABS), pryskyřic, houževnatého polystyrénu (HIPS) a do výrobků jako jsou počítače, televizory a mobilní telefony (Tomy et al., 2007). Prodává se pod obchodním názvem jako například firemaster 680 nebo FF 680. Jeho rozpustnost ve vodě je $1,9 \times 10^{-5}$ g/l při 25 °C a rozdělovací koeficienty $\log P_{ow} = 7,88$ a $\log K_{oc} = 5,66$ (Harju et al., 2009).

Tento zpomalovač hoření byl stanovován ve venkovním ovzduší USA v koncentracích od 2,8 do 70 pg/m³ (Hoh et al., 2005). Stejná studie rovněž porovnávala naměřené koncentrace BTBE s koncentracemi PBDE a zjistila, že jsou překvapivě mnohdy vyšší než koncentrace jednotlivých kongenerů PBDE, což značí buď rozšířené používání, nebo dlouhé setrvání této látky v ovzduší. Rovněž byl BTBPE stanovován ve vnitřním ovzduší. Sjödin et al. (2001) analyzoval pracovní ovzduší a stanovil koncentrace BTBPE na 41 pg/m³ v továrně na montáž plošných spojů, 3-11 pg/m³ v místnosti na opravy počítačů a 3-4,8 pg/m³ v počítačové učebně. Ač se zdají koncentrace ve vnitřním a venkovním ovzduší srovnatelné, je třeba mít na paměti, že se jedná o dvě rozdílné studie z různých států, které mohou být jinak zatíženy BTBPE. Tato látka byla také nalezena v sedimentech z jezera Michigan. Naměřené koncentrace byly nižší než u BDE-209, ale mnohem vyšší než u ostatních kongenerů jako například BDE-47, BDE-99 nebo BDE-100 (Hoh et al., 2005). Stejná studie rovněž předkládá stanovení BTBPE ve vrstvě sedimentu odpovídající roku 1973 a růst koncentrací až do roku 1985. To vypovídá o dlouhodobém používání tohoto zpomalovače v USA. BTBPE byl také stanovován v domácím prachu různými studiemi. Karlsson et al.

(2007) ustanovil koncentraci BTBPE v domácím prachu na 4,8 ng/g a Stapleton et al. (2008) stanovil koncentrace v různých obytných místnostech na 1,6 až 789 ng/g. Je zajímavé, že v druhé jmenované studii byl BTBPE detekován ve všech vzorcích z vnitřních prostor, ale stále v koncentracích výrazně nižších než u PBDE. V jiné studii zabývající se domácím prachem byly zjištěny průměrné koncentrace BTBPE 120 ng/g v domácnostech, 7,2 ng/g v kancelářích a 7,7 ng/g v autech (Harrad et al., 2008). BTBPE byl nalezen také ve vejcích z Faerských ostrovů v průměrné koncentraci 0,11 ng/g tuku. Tato koncentrace je však mnohonásobně menší než všech PBDE dohromady. BTBPE byl rovněž nalezen ve vejcích a plasmě racka šedého (*Larus hyperboreus*) v Norsku, kde však dosahoval jen malých koncentrací (maximálně 0,96 ng/g tuku) (Karlsson et al., 2006). Výsledky naznačují, že BTBPE může být nový persistentní BFR v životním prostředí, ale v současné době se mu přikládá jen okrajový význam. Nízká akumulace BTBPE může být odrazem relativně nízké log P_{ow} oproti PBDE (Verreault et al., 2007). Všechny tyto studie však dokazují používání BTBPE a jeho přítomnost v životním prostředí.

Studie porovnávající koncentrace v mořské vodě a v organismech vypočítala bioakumulační faktor pro BTBPE (log BAF) na 3,32 až 6,08 u jednotlivých druhů (Wu et al., 2011). Další studie na pstruhu duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) vystaveným BTBPE v potravě po dobu 49 dní prokázala lineární absorpční rychlost v organismu. Byl stanoven biomagnifikační faktor na 2,3, což značí vysoký potenciál k hromadění ve vodním potravním řetězci (Tomy et al., 2007). Stejná studie se rovněž zabývala metabolity BTBPE, avšak žádný nebyl v játrech detekován. Jiná studie zabývající se metabolismem ^{14}C BTBPE u laboratorních potkanů ukázala, že 99% z celkového součtu ^{14}C bylo vyloučeno stolicí a 1% bylo vyloučeno močí. Rovněž byla sledována radioaktivita jednotlivých tkání po podání a bylo zjištěno, že se objevuje ve všech tkání krom mozku (Hakk et al., 2004). Ukazuje se, že BTBPE je špatně vstřebáván ve střevech po orálním podání. Více jak 94% BTBPE bylo vyloučeno s minimálním zdržením v tkáních (Hakk et al., 2004).

Bylo zjištěno, že BTBPE je jen málo akutně toxický. Inhalační expozice BTBPE u krys ukázala letální koncentraci větší než 36,68 g/m³ po dobu 4 hodin pouze s účinky jako je změna chování, gastrointestinální změny a dermatitida (Harju et al., 2009). Dermální aplikace u králíka stanovila letální dávku na větší než 10 g/kg s nutričními a metabolickými změnami (Harju et al., 2009). Mutagenita BTBPE byla zjišťována na testech využívajících *Salmonella typhimurium* kmeny TA98, TA100, TA1535, TA1537 a TA1538 a také *Saccharomyces cerevisiae* kmen D4 a to jak v přítomnosti tak absenci metabolické aktivace. BTBPE

nezpůsobil žádnou pozitivní reakci u kteréhokoliv testu (Harju et al., 2009). Doposud nebyly prováděny žádné testy zabývající se endokrinní aktivitou této látky.

Tento zpomalovač hoření je jedním z nově se objevujících polutantů v životním prostředí a je třeba ještě dalšího vědeckého bádání na zjištění případných environmentálních rizik. Podle dostupných informací neexistuje legislativní zákaz této látky v žádné zemi.

1.2.3.3. Dekabromdifenylethan (DBDPE)

Tento zpomalovač hoření se začal na trhu objevovat od devadesátých let a v současnosti se používá jako alternativa pro deka-BDE. Prodává se pod různými obchodními názvy jako například SAYTEX 8010 nebo Milebrome 8010. Je to bílý prášek s velkou molekulovou hmotností (971,22), teplotou tání kolem 350 °C, rozpustností ve vodě $2,1 \times 10^{-7}$ g/l při 25 °C a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 11,1$ a $\log K_{oc} = 7$ (Harju et al., 2009). DBDPE se používá ve stejných výrobcích jako deka-BDE zahrnující houževnatý polystyrén (HIPS), ABS a textilie (Harju et al., 2009)

DBDPE byl stanovován ve výrobcích jako například v izolačních trubkách v přibližné koncentraci 4,8 mg/g. Očekává se zastoupení této látky v HIPS stejné jako deka-BDE, což je 12 hmotnostních procent (Kierkegaard et al., 2004). Tento zpomalovač hoření byl rovněž analyzován v domácím prachu z různých prostředí s průměrnými koncentracemi 270 ng/g pro domácnosti, 170 ng/g pro kanceláře a 400 ng/g pro automobily (Harrad et al., 2008). Zajímavé je, že v této studii byly naměřené koncentrace DBDPE v průměru vyšší než u jednotlivých kongenerů PBDE (s výjimkou BDE-209). Další studie rovněž potvrdila přítomnost této látky v domácím prachu v široké škále koncentrací od méně než 10 do 11070 ng/g s geometrickým průměrem 138 ng/g pro obývací prostor a 153 ng/g pro ložnice (Stapleton et al., 2008). Jiné studie zase udávají koncentraci v domácím prachu v průměru 47 ng/g (Karlsson et al., 2007), 293 ng/g až 789 ng/g (Ali et al., 2011). Všechny tyto studie a jejich vysoká procenta detekce této látky potvrzují její široké používání. DBDPE byl rovněž stanovován ve vnitřním ovzduší v koncentraci 0,7 ng/m³ (Kierkegaard et al., 2004) a v koncentraci 0,0229 ng/m³ (Karlsson et al., 2007). Ve druhé jmenované studii byl však DBDPE detekován pouze v jednom vzorku. Očekává se, že tato látka díky své vysoké molekulové hmotnosti bude přítomna v ovzduší převážně na částicích aerosolu (Kierkegaard et al., 2004).

Vodní systémy také nejsou ušetřeny od imisí této látky. Byly stanoveny koncentrace DBDPE v sedimentu v rozsahu od 2 do 132 µg/kg suché hmotnosti (Eljarrat et al., 2004) a také byl detekován v jednom vzorku sedimentu z Holandska v roce 2001 v koncentraci 24

µg/kg (Kierkegaard et al., 2004). DBDPE byl rovněž detekován v kalech čističek odpadních vod v koncentracích 52 ng/g a 32 ng/g (Kierkegaard et al., 2004). Ricklund et al. (2008) analyzoval DBDPE v kalech čističek odpadních vod z různých států. Jeho výsledky naznačují, že DBDPE je velmi rozšířený kontaminant v Evropě. Největší koncentrace byla pozorována v Německu (216 µg/kg suché hmotnosti) (Ricklund et al., 2008, Covaci et al., 2011). Tento zpomalovač hoření není však tak často detekován v biologických matricích. Studie potravního řetězce v jezeře Winnipeg nezjistila žádné detekovatelné hodnoty u zooplanktonu a mušlí, avšak byly stanoveny koncentrace u ryb v maximu u 1 µg/kg tuku (Law et al., 2006). Jiná studie zabývající se různými druhy vodních ptáků žijících poblíž recyklačního zařízení na elektrický odpad v Číně detekovala DBDPE ve všech vzorcích z těl ptáků krom jednoho s maximální koncentrací 800 µg/kg tuku (Covaci et al., 2011). Byly zjišťovány i koncentrace DBDPE v tělech savců. Různé tělní orgány pandy velké a červené byly podrobeny analýze a DBDPE byl nalézán ve většině vzorcích. Maximální koncentrace byla detekována v gonádách (863 ng/g tuku) (Covaci et al., 2011). Všechny zjištěné výsledky naznačují biomagnifikaci v potravním řetězci. BMF pro DBDPE ve vodním potravním řetězci z jezera Winnipeg byl v rozsahu od 0,2 do 9,2 (Law et al., 2007).

Bylo shledáno, že tento zpomalovač není akutně toxický. Jednotná i dlouhodobá (90 dní) dávka u krys ukázala letální dávku LD₅₀ větší než 5000 mg/kg tělesné hmotnosti. Vysoké dávky přinesly změny v hmotnosti jater. Akutní dermální toxicita byla měřena na králících a určená LD₅₀ byla vyšší než 2000 mg/kg váhy (Harju et al., 2009). Nízká akutní toxicita je zřejmě důsledkem nízké biologické dostupnosti, vysoké molekulové hmotnosti a nízké rozpustnosti ve vodě. V současné době nejsou dostupné žádné další informace o toxickém působení této látky jakožto i o endokrinní aktivitě.

Tento zpomalovač hoření je jedním z nově používaných a méně známých. Nicméně už byl stanovován v několika environmentálních matricích a v tělech živočichů. Jen málo je zatím známo o jeho možném toxickém působení.

1.2.3.4. Bis(2-ethylhexyl) tetrabromftalát (TBPH)

Tento zpomalovač hoření je také jedním z nově používaných převážně jako aditivní zpomalovač a plastikátor do polyvinylchloridu (PVC) a neoprenu a také do kabelové a vodičové izolace, folií, podložkách pod koberce, tkanin, tapet a lepidel (Covaci et al., 2011). TBPH je spolu s 2-ethylhexyl 2,3,4,5-tetrabrombenzoátem (TBB) součástí komerční směsi Firemaster 550, který se používá jako náhražka za penta-BDE (Stapleton et al., 2008). Udává

se, že v této směsi je poměr TBB:TBPH 4:1. TBPH byl také nalezen i v dalších komerčně vyráběných směsích. Je to nažloutlá kapalina s teplotou varu $584,8 \pm 45$ °C, rozpustností ve vodě $1,6 \times 10^{-6}$ g/l a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 10,084$, $\log K_{oc} = 6,86$ (Harju et al., 2009).

TBPH byl detekován v kalech čističek odpadních vod v San Francisku. Koncentrace se pohybovaly v rozsahu od 57 do 515 ng/g (Covaci et al., 2011). Tento zpomalovač hoření byl také stanovován v domácím prachu britských a belgických měst v průměrných koncentracích 381 ng/g pro učebny, 212 ng/g pro domácnosti a 95 ng/g pro kanceláře (Ali et al., 2011). V této studii byl TBPH detekován téměř ve všech vzorcích prachu. Jiná studie zabývající se domácím prachem rovněž detekovala TBPH ve všech vzorcích a to v geometrických průměrech 234 ng/g pro obývací prostory a 105 ng/g pro ložnice (Stapleton et al., 2008).

Zatím není známo téměř nic o možném rozkladu této látky v životním prostředí. Byl prováděn pouze experiment zjišťující možnou fotodegradaci této látky se závěry, že TBPH podléhá fotodegradaci za vzniku převážně méně bromovaných izomerů (Davis et al., 2009). Rovněž bylo v této studii zjištěno, že TBB podléhá fotodegradaci snáze než TBPH, což by mohlo vysvětlit jiný poměr těchto látek nacházených v domácím prachu a v komerčně vyráběných směsích.

V současné době nejsou známy koncentrace v biologických matricích ani toxické účinky (jak akutní tak dlouhodobé) této látky. Rovněž nejsou žádné studie popisující bioakumulaci nebo biodegradaci v životním prostředí.

TBPH je nově používaným zpomalovačem hoření, který se začal objevovat v životním prostředí. Studie zabývající se touto látkou ji detekují téměř ve všech odebraných vzorcích, což značí její rozšířené používání, nicméně doposud nejsou známy žádné toxické účinky na člověka a organismy a také není znám osud této látky v životním prostředí (bioakumulace, degradace, metabolity, atd.)

1.2.3.5. Anhydrid kyseliny tetrabromftalové (TBPA)

TBPA je nově vyráběný aditivní nebo reaktivní zpomalovač hoření. Používá se do nesaturovaných polyesterů, polyuretanových pěn, papíru, textilu, epoxidů a vlny (Harju et al., 2009). Prodává se pod různými obchodními značkami jako například Bromphthal, Firemaster PHT 4 nebo Saytex RB 49. Je to bílý prášek s teplotou tání kolem 178 °C, rozpustností ve vodě $2,4 \times 10^{-2}$ g/l a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 3,779$ a $\log K_{oc} = 3,43$ (Harju et al., 2009).

TBPA byl nalézán v půdě převážně hydrolyzovaný za vzniku kyseliny tetrabromftalové. Byla pozorována jen malá volatilace z půdy a vysoký navázaný podíl v půdě (Tice, 1999). Tento zpomalovač byl shledán, že má mírný pozitivní účinek na půdní bakteriální společenstvo (zvýšení početnosti) při koncentraci 10 µg/g. Půdní houby nebyly touto látkou nijak ovlivněny (Tice, 1999). TBPA nebývá často detekován v životním prostředí. V dánské studii zabývající se sedimentem byla tato látka pod mezí detekce (Covaci et al., 2011). Po vystavení UV záření je TBPA rychle hydrolyzován (poločas menší než 5 minut) za vzniku dikarboxylové kyseliny (Tice, 1999).

Tato látka byla testována na laboratorních potkanech při orálním podání. Ukázalo se, že TBPA se v těle hydrolyzuje na kyselou formu a částečně se absorbuje v trávicím traktu. Absorbovaná část je rychle vylučována močí převážně jako kyselina. Neabsorbovaná část (téměř 75%) se vyloučí ve stolici během 48 hodin (Tice, 1999). Další farmakokinetické studie ukázaly, že celková část reziduí po 48 hodinách ve všech tkáních tvoří jen 0,2% dávky. Ze zjištěných výsledků se neočekává, že by se tato látka kumulovala v těle člověka (Tice, 1999).

Ukazuje se, že TBPA je velmi málo akutně toxický s LD₅₀ přesahující 10000 mg/kg hmotnosti pro krysy u orálního podání. Rovněž nebyly pozorovány žádné teratogenní účinky (Tice, 1999). Byly prováděny testy na mutagenitu u *Salmonella typhimurium* kmeny TA98, TA100, TA1535, TA1537, a TA1538 a také u *Saccharomyces cerevisiae* kmen D4. TBPA (v dávkách od 0,1 do 10,000 µg/test) v přítomnosti i při absenci metabolické aktivace neprokázal žádnou mutagení aktivitu (Tice, 1999). Na druhou stranu studie zjišťující možnou aktivaci Ah-receptoru touto látkou zjistila přímou schopnost komerční směsi Firemaster PHT4 (kde je hlavní komponent TBPA) aktivovat AhR *in vitro* (Brown et al., 2004)

Tento zpomalovač hoření je jedním z velmi málo prozkoumaných z hlediska environmentálních koncentrací (což může být dáno jeho snadným rozkladem) a do účinků na lidské zdraví. Je proto třeba zabývat se touto látkou právě v těchto oblastech.

1.2.3.6. 2,3,4,5,6-pentabromethylbenzen (PBEB)

Tento zpomalovač hoření je používán do textilií, lepidel, polyuretanových pěn, polyesterových pryskyřic, nátěrových hmot a také jako přísada pro nenasycené polyestery (WHO, 1997). Byl vyráběn pod obchodním názvem FR-105 hlavně v sedmdesátých a osmdesátých letech v USA (Covaci et al., 2011). Je to bílý prášek s teplotou tání 138 °C, rozpustností ve vodě $3,5 \times 10^{-4}$ g/l a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 6,403$ a $\log K_{oc} = 4,86$ (Harju et al., 2009). 2,3,4,5,6-pentabromethylbenzen se vyráběl převážně v sedmdesátých a osmdesátých letech, nicméně v Evropě se tento zpomalovač vyráběl i

v roce 2002 (Hoh et al., 2005). V současné době už PBEB není vyráběn v žádné signatářské zemi OSPAR (de Wit et al., 2010).

PBEB byl stanoven v ovzduší a to jak na částicích aerosolu, tak v plynné fázi v koncentracích 29 pg/m³ pro aerosolovou frakci a 520 pg/m³ pro volnou frakci (Hoh et al., 2005). Studie zabývající se atmosférickou depozicí BFR v polárních oblastech zjistila mírné narůstání depozice PBEB od sedmdesátých let, avšak stále nedosahuje hodnot pro známější zpomalovače jako například deka-BDE nebo HBCD (Hermanson et al., 2010).

Studie porovnávající koncentrace v mořské vodě a v organismech vypočítala bioakumulační faktor pro PBEB (log BAF) na 2,72 až 4,09 u jednotlivých druhů (Wu et al., 2011). Tento zpomalovač byl také stanovován v biologických matricích ptáků. Venier et al. (2010) detekoval PBEB ve dvou vzorcích plazmy orla bělohlavého (*Haliaeetus leucocephalus*) s průměrnou koncentrací 0,11 ng/g. Vzorky byly odebrány v okolí velkých kanadských jezer (Venier et al., 2010). Jiná studie zabývající se vejci racka stříbřitého (*Larus argentatus*) stanovila koncentrace v rozmezí od 0,03 do 1,4 ng/g. Tato studie byla rovněž prováděna v okolí velkých kanadských jezer (Gauthier et al., 2007). Tento zpomalovač hoření byl také detekován v tukových tkáních tuleně grónského (*Pagophilus groenlandicus*), čepcola hřebenatého (*Cystophora cristata*) a velryby černé (*Eubalaena glacialis*) v koncentracích menších než 0,02 až do 6,68 ng/g tuku (Montie et al., 2010). PBEB byl poměrně hojně stanovován v říčním sedimentu poblíž Barcelony (Španělsko). PBEB byl detekován ve 13 z 19 vzorků v koncentracích od 3,1 do 10 ng/g suché váhy (Guerra et al., 2010).

Tato látka nebyla zatím detekována v krevní plasmě u člověka. Studie, která analyzovala krevní plazmu u různých skupin lidí, nezjistila žádné detekovatelné koncentrace PBEB (Zhu et al., 2009).

PBEB byl testován na toxicitu u králíků, kde byla zjištěna akutní toxicita s LD₅₀ vyšší než 8 g/kg (Harju et al., 2009). Rovněž byla tato látka testována na mutagenitu testem využívajícím *Salmonella Typhimurium* kmeny TA98, TA100, TA1535, a TA1537 s a bez přítomnosti metabolické aktivace. Žádná mutagenní aktivita nebyla pozorována ani při nejvyšších koncentracích (Harju et al., 2009). Není doposud známo žádné další toxické působení jakožto ani endokrinní aktivity nebo metabolické pochody u této látky.

Tento zpomalovač hoření je považován za jednoho z nově používaných, nicméně není stále jasné, jestli jeho přítomnost v environmentálních matricích je způsobena zvýšeným používáním v posledních letech nebo je způsobena persistencí této látky v životním prostředí.

Je třeba dalšího výzkumu hlavně z hlediska toxického působení na člověka a osudu této látky v životním prostředí.

1.2.3.7. 2,3,4,5,6-pentabromtoluen (PBT)

PBT je dalším ze skupiny nových zpomalovačů hoření. Je vyráběn jako bílý prášek s teplotou tání kolem 285 °C, rozpustností ve vodě $7,8 \times 10^{-4}$ g/l a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 5,87$ a $\log K_{oc} = 4,57$ (Harju et al., 2009). PBT je používán hlavně v nesaturovaných polyesterech v elektrických zařízeních a dále v polyethylen, polypropylen, polystyren, textilu, ABS a další (Covaci et al., 2011). Jeho výroba je odhadována mezi 1000 až 5000 tunami za rok a prodává se pod obchodními názvy jako například Flammex nebo FR-105 (Covaci et al., 2011).

Udává se, že tento zpomalovač má potenciál k dálkovému transportu atmosférou podobně jako dříve používané PBDE. Byl stanovován ve vzduchu nad Grónským mořem v koncentracích od 0,001 do 0,02 pg/m³ pro plynnou fázi a až 0,001 pg/m³ navázán na částice. Zajímavé je, že u plynné fáze byl PBT detekován ve všech vzorcích (Möller et al., 2011). Stejná studie se také zabývala mořskou vodou, ale PBT byl ve vodě pod detekčním limitem. Jiná studie také detekovala PBT ve vzorku vzduchu v koncentraci 0,02 pg/m³. U ostatních vzorků však byl pod mezí detekce (0,01 pg/m³) (Gouteux et al., 2008). Stejná studie rovněž prokázala schopnost PBT tékat a dostávat se tak do ovzduší. Tato volatilizace je značně urychlena teplotou. Tento zpomalovač byl také stanovován v sedimentu řeky Labe, kde se koncentrace pohybovaly v rozmezí od menších než 1 do 25 ng/g suché hmotnosti (Schwarzbauer et al., 2001).

Studie porovnávající koncentrace v mořské vodě a v organismech vypočítala bioakumulační faktor ($\log BAF$) na 2,04 až 4,77 u jednotlivých druhů (Wu et al., 2011). Koncentrace PBT v různých organismech potravního řetězce dosahovaly od 1,2 do 3,6 ng/g tuku (Wu et al., 2010). Stejná studie rovněž pozorovala snižování koncentrace s postupným růstem živočicha v trofickém stupni. PBT byl detekován v plasmě a vejcích racka šedého (*Larus hyperboreus*) v maximálních koncentracích 0,15 ng/g pro samce, 0,06 ng/g pro samice a 0,12 ng/g pro vaječné žloutky (Verreault et al., 2007). Jiná studie taktéž detekovala PBT ve vejcích racka stříbřitého (*Larus argentatus*) a to v koncentracích od 0,004 do 0,02 ng/g mokré váhy. Nutno podotknout, že v této studii dosahoval PBT nejnižších koncentrací ze všech zkoumaných BFR (Gauthier et al., 2007). Tento zpomalovač hoření byl také detekován v tukových tkáních tuleně grónského (*Pagophilus groenlandicus*), čepcola hřebenatého

(*Cystophora cristata*) a velryby černé (*Eubalaena glacialis*) v koncentracích menších než 0,02 až do 0,68 ng/g tuku (Montie et al., 2010).

Byly prováděny toxikologické studie na laboratorních potkanech, kde byl PBT podáván orálně v dávkách v rozmezí od 0,05 do 500 mg/kg po dobu 91 dní. Nebyly pozorovány žádné známky toxicity PBT, pouze byly nalezeny histologické změny na štítné žláze, játrech a ledvinách. NOAEL byla stanovena na 0,35 mg/kg váhy na den (Harju et al., 2009). Letální koncentrace pro ryby byla zjištěna >5 mg/l (Harju et al., 2009). PBT byl testován na mutagenitu pomocí testů využívajících kmeny *Salmonella Typhimurium* TA98, TA100, TA1535, a TA1537 s a bez přítomnosti metabolické aktivace. Nebyla pozorována žádná mutagenní aktivita (Harju et al., 2009). Testy zjišťující vazbu PBT a aktivaci Ah receptoru prokázaly schopnost této látky vázat se na daný receptor. Výsledky také ukázaly, že tato sloučenina je schopna stimulovat AhR závislou expresi genů (AhR dependent gene expresion) při vysokých koncentracích. Nutno podotknout, že tato schopnost je však výrazně menší než u TBPA a deka-BDE (Brown et al., 2004). Do dnešního dne neexistuje žádná další studie popisující endokrinní působení této látky.

O tomto novém zpomalovači hoření je známo zatím jen velmi málo, a tak je třeba dalšího zkoumání hlavně v oblasti osudu této sloučeniny v životním prostředí a možném negativním působení na lidské zdraví podobně jako u PBEB.

1.2.3.8. Hexabrombenzen (HBB)

Tato látka je také jedním z nových zpomalovačů hoření. Je používána do papíru, vlny, textilu, elektronických a plastových produktů (Covaci et al., 2011). Je to bílý prášek s teplotou tání 326 °C, rozpustností ve vodě $1,1 \times 10^{-7}$ g/l a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 6,07$ a $\log K_{oc} = 4,56$ (Harju et al., 2009; Kuramochi et al., 2004). HBB je produkován převážně v zemích východní Asie. V Číně se vyrábí 600 tun/rok této látky jednou chemickou firmou. V Japonsku se HBB prodává pod obchodním názvem FR-B (Covaci et al., 2011). V Evropě není zaznamenána výroba tohoto zpomalovače (Covaci et al., 2011).

Hexabrombenzen je hojně stanovován ve vzorcích z polárních oblastí. Möller et al. (2011) detekoval HBB ve všech atmosférických vzorcích a to jak v plynné fázi tak navázaný na částice. Měřené koncentrace byly v rozmezí od 0,04 do 0,66 pg/m³ pro plynnou fázi a od 0,001 do 0,005 pg/m³ navázaný na částice. Rovněž byl HBB detekován v mořské vodě, ale o poznání méně často než v ovzduší. Maximálních koncentrací dosahoval 0,003 pg/l jako rozpuštěný a 0,002 pg/l navázaný na částicích (Möller et al., 2011). Jiná studie taktéž detekovala HBB v ovzduší a to v koncentracích od 0,02 do 0,09 pg/m³ (Gouteux et al., 2008).

V této studii bylo rovněž prokázáno vytěkávání HBB z komerčně dostupné směsi a to i více než 100 ng/g za hodinu při zahřívání. Nejvyšší koncentrace HBB v ovzduší byly nalezeny v jedné čínské studii, která prezentuje koncentrace v rozmezí od 0,3 do 6,5 pg/m³ (Qiu et al., 2010). V této studii byl rovněž tento zpomalovač detekován ve vodě s průměrnou koncentrací 7,7 pg/l.

Tato látka se v životním prostředí může kumulovat v organismech. Studie, zkoumající schopnost žíhal kumulovat v sobě různé polutanty podávané v potravě, prokázala zvyšování koncentrací v tělech. Byl stanoven biomagnifikační faktor (BMF) (koncentrace v žížale/koncentrace v potravě) na 0,164, který je téměř nezávislý na koncentraci dané látky v potravě (Belfroid et al., 1995). HBB byl detekován v plasmě volně žijících racků šedých (*Larus hyperboreus*) v maximální koncentraci 0,15 ng/g mokré váhy. Vyšších hodnot a procent detekce dosahovaly vzorky od samců (Verreault et al., 2007). Stejná studie také zjišťovala koncentrace ve vejcích, kde byl HBB detekován ve všech vzorcích v rozmezí koncentrací od 0,42 do 2,64 ng/g. Jiná studie také hojně nalézala tento zpomalovač ve vejcích. Gauthier et al. (2007) stanovoval koncentrace v rozmezí od 0,24 do 0,53 ng/g pro vaječné žloutky racků stříbřitých (*Larus argentatus*). Hexabrombenzen byl rovněž detekován v lidských tkáních v jedné japonské studii v rozmezí od 2,1 do 4,1 ng/g čerstvé váhy. Rovněž byly nalezeny další méně bromované benzeny, které byly určeny jako metabolické produkty rozkladu HBB (Harju et al., 2009).

Nejnižší toxická dávka pro HBB podávaná orálně byla stanovena na 150 mg/kg váhy u laboratorních potkanů. Tato dávka měla biochemické účinky na játra a porfyriny včetně žlučových barviv. Vyšší dávky po dobu 12 týdnů měly účinky na játra, inhibici, indukci nebo změny enzymů a na esterázu (Harju et al., 2009). U myši při podávání 20 až 90% přibližné letální dávky nebyly zaznamenány žádné histopatologické změny, ale HBB způsobil pokles hladiny glutathionu v játrech a zvýšení malondialdehydu (Harju et al., 2009). Nejnižší toxická dávka pro orální expozici u ptáků byla stanovena na 1,5 g/kg za 15 dnů pro křepelky a 52,5 g/kg za 12 týdnů pro kuřata. Účinky byly podobné jako u potkanů (Harju et al., 2009). Nebyly pozorovány žádné teratogenní účinky u potkanů během 5. a 15. dne březosti ani u maximálních koncentrací 200 mg/kg váhy (Harju et al., 2009). V jiné studii HBB vyvolával u potkanů zvýšení hladiny porfirinů. Toto zvýšení bylo statisticky průkazné, a tak autoři studie uvádějí, že tato látka je porfirinogen (Szymańska a Piotrowski, 2000). Široká škála koncentrací (10 až 10000 µg/test) byla testována na mutagenitu pomocí *Salmonella typhimurium* kmeny TA98, TA100, TA1535, a TA1537 vždy s nebo bez přítomnosti metabolické aktivace. Všechny testy však byly negativní (Harju et al., 2009). U HBB byla

taktéž zjišťována schopnost vazby a aktivace AhR. Výsledky ukazují, že HBB aktivuje při vysokých koncentracích AhR závislou genovou expresi a to v podobné míře jako deka-BDE (Brown et al., 2004). HBB nebyl prokázán jakožto agonista ani antagonist androgenního receptoru u lidských jaterních buněk (Larsson et al., 2006)

Hexabrombenzen je novým zpomalovačem hoření, který se objevuje jak v životním prostředí tak v tělech a tkání lidí. Jen málo je však známo o jeho osudu v prostředí a jeho možném rozkladu mikroorganismy. Také ještě nebylo zjišťováno možné působení této látky na estrogení receptor.

1.2.3.9. 2-allyloxy-1,3,5-tribrombenzen (ATBB)

Tento zpomalovač hoření je také v literatuře označován jako 2,4,6-tribromophenyl allyl ether. Správný český název této látky je 1,3,5-tribrom-2-(2-propylen-1-yloxy)benzen. ATBB je produkován pod obchodními názvy jako PHE-65, milebrome TBPAE a další. Je to bílý prášek s rozpustností ve vodě 0,02 g/l a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 4,974$ a $\log K_{oc} = 4,08$ (Harju et al., 2009). ATBB se využívá jako reaktivní BFR, když se přimíchává při fázi polymerizace, a také jako aditivní BFR hlavně v expandovaném polystyrénu (EPS) a polystyrénové pění (Covaci et al., 2011). Byla známa výroba ATBB v Německu od osmdesátých let, ale v současné době již nejsou informace o jeho další výrobě. Produkce této látky v USA v roce 2006 se blížila k 227 tunám (Covaci et al., 2011).

Při modelování výskytu ATBB v životním prostředí podle fyzikálních vlastností se dospělo k závěru, že tento zpomalovač hoření má potenciál být polutantem v arktických oblastech a že má podobnou strukturu jako už známé arktické kontaminanty (Brown a Wania, 2008). ATBB byl detekován v 15 z 18 vzorků kalů z čističek odpadních vod v Německu. Maximální nalezené koncentrace byly 0,091 mg/kg suché váhy. Ukazuje se, že této látka nepodléhá rozkladu během procesu čištění odpadních vod (Harju et al., 2009).

ATBB byl nalezen v tuku a mozku tuleně grónského (*Pagophilus groenlandicus*) a čepcola hřebenatého (*Cystophora cristata*) v koncentracích od 5,4 až 9,1 ng/g pro čepcola a od 3,1 do 10 ng/g pro tuleně (von Recke a Vetter, 2007). Autoři rovněž předkládají aerobní degradaci 2,3-dibrompropyl-2,4,6-tribromfenyl etheru (DPTE) pomocí corrinoidních látek právě na ATBB. Autoři se domnívají, že přítomnost ATBB v tuku a mozku vodních savců je způsobena právě metabolickým rozkladem DPTE.

Tento zpomalovač hoření je jedním z nových a ještě velmi málo prozkoumaných. Je potřeba zjistit hlavně možné toxické působení, vstup a osud této látky v životním prostředí.

1.2.3.10. Pentabrombenzyl akrylát (PBBA)

Tato látka má správný český název (2,3,4,5,6-pentabromfenyl)methyl-propeonát. PBBA se řadí mezi nové bromované zpomalovače hoření a patří mezi nejméně prozkoumané. Je to bílý prášek s rozpustností ve vodě $1,4 \times 10^{-3}$ g/l a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 5,46$ a $\log K_{oc} = 4,35$ (Harju et al., 2009). Používá se v polybuthylentereftalátu, polyethylentereftalátu a ABS (Covaci et al., 2011). Na trhu se dá tato látka sehnat pod obchodním názvem FR-1025M. Jeho využívání a pozitivní vliv na vlastnosti v polypropyleny jsou dokládány několika studiemi (Dvir et al., 2001, 2003; Muskatell et al., 1997).

O tomto zpomalovači hoření nejsou dostupné žádné informace o přítomnosti v životním prostředí, biodegradaci nebo jiném osudu této látky. Rovněž nejsou známy žádné toxické účinky jak na člověka tak na živočichy, a tak je třeba dalšího výzkumu téměř ve všech oblastech.

1.2.3.11. 2,4,6-tribromfenol (TBP)

Tato látka je už poměrně dobře známá z dřívějších let. Její teplota tání je 95 °C, rozpustnost ve vodě 0,968 g/l a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 4,326$ a $\log K_{oc} = 2,98$ (Harju et al., 2009). TBP se používá jako antiseptický a germicidní prostředek ve farmaceutických přípravcích. Také se používá jako zpomalovač hoření v termoplastických polyesterech, epoxy pryskyřicích, ABS pryskyřicích a v polystyrénu. Je využíván jako fungicid pro ošetření dřeva a pro výrobu dalších bromovaných látek jako například BTBPE (Covaci et al., 2011; Harju et al., 2009; Mardones et al., 2008). Je také nutné zmínit, že TBP vzniká v malé míře přirozeně v mořských řasách (Flodin a Whitfield, 1999). Tato látka je vyráběna pod různými obchodními názvy jako například PH-73FF, FR-613 a další. Výroba TBP v USA činila 23000 tun v roce 2006. V Japonsku bylo vyrobeno 2500 tun a celosvětově 9500 tun v roce 2001 (Contreras et al., 2009).

TBP byl stanoven v domácím prachu v koncentracích od 16 do 130 ng/g pro domácnosti a od 27 do 620 ng/g pro kanceláře v Japonsku (Takigami et al., 2009). Nutno podotknout, že tento zpomalovač hoření patří k nejvíce těkavým, a tak se předpokládá jeho hojné zastoupení ve vnitřním ovzduší. Studie zabývající se laboratorním ovzduším zařadila TBP mezi nejvíce zastoupené BFR spolu s kongenery PBDE (Thomsen et al., 2001). Tento zpomalovač byl také stanovován ve vodách. Ve studii zabývající se různými BFR v kalech dvaceti dvou čističek odpadních vod byl detekován TBP v maximální koncentraci 0,9 ng/g čerstvé hmotnosti (Öberg et al., 2002). Během výzkumu sedimentů a vody v Severním a Baltském moři byl TBP nalezen ve vzorcích vody v maximální koncentraci 6 ng/l, ale nebyl

nalezen v žádném vzorku sedimentu (Reineke et al., 2006). Jiná studie stanovovala koncentrace TBP v mořské vodě při pobřeží Koreje od 0,378 do 20,2 ng/l (Sim et al., 2009). Stejný článek také přináší naměřené hodnoty v mořském sedimentu a to v koncentracích od 0,56 do 12,3 ng/g suché váhy. Krevety ulovené poblíž Austrálie obsahovaly TBP v průměrných koncentracích 7,8; 8,5; 41; 97 ng/g u různých zálivů (Whitfield et al., 1992). Oliveira et al. (2009) analyzoval vzorky svaloviny dvou druhů ryb. Koncentrace TBP se pohybovaly v rozmezí od 15 do 171 ng/g pro *Lutjanus synagris* a od 6 do 119 ng/g pro *Ocyurus chrysurus*. Deset druhů ryb, které byly nachytány v srpnu 1992 u pobřeží Austrálie, obsahovalo TBP v maximální koncentraci 3,4 ng/g pro upravené ryby na prodej (Whitfield et al., 1995). O něco vyšších koncentrací dosahovaly masožravé ryby, což by navádělo k možné biomagnifikaci. Tato látka byla také detekována v hnědých řasách (14 až 38 ng/g čerstvé hmotnosti), červených řasách (4,5 až 68 ng/g), bryozoích (24 až 27 ng/g), žahavcích (29 ng/g) a houbách (0,22 až 240 ng/g) nalovených poblíž Austrálie v říjnu 1990 (Whitfield et al., 1992). TBP byl také detekován v červeném víně a to v koncentracích od 3,6 do 392,6 ng/l (Chatonnet et al., 2004). Všechny tyto studie ukazují na rozšířené používání tohoto zpomalovače a jeho přítomnost v životním prostředí. TBP byl navržen jako jedna ze 120 chemických látek, které jsou strukturně podobné jako známé arktické polutanty (Brown a Wania, 2008).

Degradace této látky byla zkoumána několika experimenty. Contreras et al. (2009) popsali, že až 92% TBP bylo degradováno za vhodných podmínek pomocí fentonové reakce. Při studiu biodegradace směsnou kulturou mikroorganismů v půdě byly spočítány poločasy rozkladu TBP na 8 a 10 dní pro aerobní podmínky a 7 dní pro anaerobní podmínky (Nyholm et al., 2010). Kultury mikroorganismů byly odebrány z kalů čističek odpadních vod po různých úpravách (aktivace, digesce, hygienizace). Tyto výsledky by mohly napovědět, co se s danými látkami stane, když se tento kal vpraví do půdy. Ukazuje se, že během procesu aktivace na ČOV dochází k snadné degradaci TBP za vzniku bromidů (Brenner et al., 2006). V jiné studii zabývající se bakteriální degradací TBP ve vodách bylo zjištěno, že společenstvo bakterií potřebuje jistou dobu na adaptaci (závislou na teplotě). Po této době probíhá degradace TBP už velice rychle (zhruba 4 dny k úplné degradaci) (Aguayo et al., 2009). Byly prováděny i biodegradční pokusy využívající ligninolytické houby. Donoso et al. (2008) ve své studii prokázal, že *Trametes versicolor* nejen že má rezistenci vůči této látce, ale také jí dokáže rychle degradovat. Už po 4 dnech trvání pokusu byl zaznamenán 98,5% úbytek TBP a zvýšená lakázová aktivita, která může být příčinou této degradace. Jiná studie využívající

taktéž *Trametes versicolor* prokázala degradaci TBP už během prvního dne inkubace a po 4 dnech byl úbytek látky kolem 65% (Uhnáková et al., 2009).

Byly také zjišťovány toxické efekty TBP. U akutní toxicity pro potkany při orálním podání byla spočítána LD₅₀ na 1,995 mg/kg pro samce a 1,819 mg/kg pro samice (Harju et al., 2009). Jiná studie zase udává dávky LD₅₀ 5,012 mg/kg pro samce i samice. Známky toxicity se projevovaly sníženou motorickou aktivitou, výtoky z nosu, slzením, třesem, únavou, křečemi a smrtí (Harju et al., 2009). Inhalační toxicita ukázala LC₅₀ vyšší než 1630 mg/m³ za 4 hodiny (Harju et al., 2009). Při studii inhalace prachových částic s TBP se ukázala LC₅₀ vyšší než 1,63 mg/l za 4 hodiny. Jiná studie zase udává LC₅₀ vyšší než 200 mg/l za 1 hodinu (Harju et al., 2009). Známky toxicity byly výtoky z nosu, šilhání očí, změna dechové frekvence, únava, slinění a změna motorické aktivity. Dermální podání TBP na králících ukázalo LD₅₀ větší než 2000 mg/kg (Harju et al., 2009). Při studii vývojové neurotoxicity a imunotoxicity byly březí samice potknů vystaveny TBP inhalační cestou v koncentracích od 0,03 do 1 mg/m³. Výsledky ukazují, že tento zpomalovač může působit vývojově neurotoxicky, embryotoxicky a toxicky pro plod, ale nepůsobil imunotoxicky (Harju et al., 2009). Studie zabývající se toxicitou směsí BFR pro *Nitocra spinipes* určila TBP za jeden z méně toxických zpomalovačů s LC₅₀ 920 µg/l pro akutní toxicitu (Breitholtz et al., 2008). TBP byl testován na mutagenitu pomocí testů se *Salmonella typhimurium* kmeny TA98, TA100, TA1535, TA1537 a TA1538 a *Saccharomyces cerevisiae* kmen D4 vždy s nebo bez přítomnosti metabolické aktivace. Výsledky byly negativní ve všech testech (Harju et al., 2009). TBP byl studován na zjištění možného narušení hormonální regulace. Olsen et al. (2002) prokázal slabou vazbu této látky na estrogenní receptor (ER) pomocí testu využívající výměny 17β-Estradiolu na ER. V tomto testu bylo dosaženo jen 43% výměny u nejvyšších zkoumaných koncentrací. V jiné studii byl pozorován antagonistický vliv na ER s IC₅₀ 8,3 µM a také malá inhibice sulfatace estradiolu (Hamers et al., 2006). Ve stejné studii byla také popsána výrazná schopnost TBP nahradit thyroxin (T4) na transportním proteinu transthyretinu (TTR). Schopnost vazby TBP na thyroideální receptor byla až 10x větší než u samotného T4 (Hamers et al., 2006). V této studii byla popsána i jistá schopnost antagonistického působení této látky na AR a PR. TBP byl rovněž zkoumán co do vlivu na enzym aromatázu (CYP 19) pomocí buněčných linií kůry nadledvinek H295R (Cantón et al., 2005). Výsledky prokázaly koncentrační závislost činnosti aromatázy na TBP v rozmezí koncentrací od 0,5 do 7,5 µM a potvrdily tak ovlivnění enzymu touto látkou.

Vzhledem ke zjištěným toxickým účinkům této látky je velmi závažné, že TBP byl stanovován také v krevní plasmě člověka. Thomsen et al. (2001) analyzoval plasmu od tří

skupin pracovníků s elektronickým zařízením a laboratorního personálu. Koncentrace TBP se pohybovala v rozmezí od 0,17 do 81 ng/g tuku (Thomsen et al., 2001). Jiná studie dokonce detekovala TBP v pupeční šňůře japonských rodiček a to ve všech odebraných vzorcích. Průměrná koncentrace byla stanovena na 33 pg/g čerstvé váhy (Kawashiro et al., 2008). V této studii byl TBP detekován i v krvi matky a pupečnickové krvi, a proto lze usuzovat, že tato látka je schopna přecházet přes placentální bariéru a ovlivňovat plod.

Závěrem lze říct, že TBP je už známá látka, která má i jiné využití než jako zpomalovač hoření, a je hojně zastoupena v životním prostředí. Biodegradace této látky je poměrně snadná a rychlá, avšak v lidském těle může mít závažný dopad hlavně na procesy hormonální regulace. V současné době je třeba chybějící legislativy k zákazu této látky.

1.2.3.12. Dekabrombifenyl (DBB)

DBB patří ke skupině bromovaných bifenyly. Tyto látky se začaly používat v sedmdesátých letech jako komerční směsi zprvu spíše méně bromovaných kongenerů a posléze po neúmyslné kontaminaci krmiva pro dobytek se začaly vyrábět i více bromované, jejichž součástí byl i dekabrombifenyl (BB-209). Komerční směsi měly různé názvy podle výrobce, například Berkflam B 10 nebo Flammex B-10 vyráběný v Londýně (WHO, 1994). Udává se, že v Evropě se směsi vícebromovaných bifenyly vyráběly do roku 2000 (Alaee et al., 2003). DBB je bílý prášek s $\log P_{ow} = 10,26$. Polybromované bifenyly se používaly jako zpomalovače hoření do textilií, elektronických zařízení a plastů (Vetter et al., 2008). DBB se používal i do ABS (Hirschler a Tsika, 1983; Donaldson et al., 1983). Podle Evropské unie je tolerováno jeho používání ve výrobcích až do 0,1% hmotnosti (Europien commission 2005, European Commission Decision 2005/618/EC)

Bylo pozorováno vytékávání DBB z ABS za zvýšené teploty (Donaldson et al., 1983), a tak lze předpokládat jeho přítomnost ve vnitřním ovzduší. Tento zpomalovač byl detekován v prachu odebraném ve skladu elektrického odpadu. DBB dosahoval koncentrací v průměru 260 ng/g (Muenhor et al., 2010). Jiná studie rovněž detekovala BB-209 v prachu odebraném poblíž rybníční soustavy a to v koncentraci 37,9 ng/g sušiny (Sawal et al., 2008). Předpokládá se, že v životním prostředí nebo v tělech živočichů dochází k dehalogenizaci DBB za vzniku méně bromovaných kongenerů (Vetter et al., 2008), a tak přítomnost některých okta-BB v životním prostředí je přisuzována právě metabolickým procesům v tělech živočichů.

Byly prováděny studie, které prokazatelně doložily schopnost BB-209 aktivace Ah receptoru na jaterních buňkách prasat. Tato aktivace vzrůstala s koncentrací BB-209 až do nejvyšší zkoumané koncentrace 20 μM (Alonso et al., 2008). Tato látka je však

z geometrického hlediska neschopná toho aby se vešla do vazebného místa receptoru a tak vyvolává další otázky o možných mechanismech aktivace AhR (Alonso et al., 2008). Jiná studie rovněž potvrdila schopnost BB-209 aktivovat AhR *in vitro* (Brown et al., 2004). V této studii byly prováděny biotesty, které doložily aktivaci Ah receptoru touto látkou (Brown et al., 2004). Nejsou doposud známy další toxické účinky, které by se mohly vztáhnout k této látce.

Je překvapivé, že o této látce je pouze málo vědeckých článků. Není stále vyjasněna degradace této látky v životním prostředí a také endokrinní aktivity spojené s estrogenními a androgenními receptory.

1.2.3.13. Tetrabrombisfenol A bis(dibrompropyl ether) (TBBPA-DBPE)

Tato látka má správný český název 2,2-bis[(3,5-dibrom-4-(2,3-dibrompropoxy)fenyl]propan. Tento zpomalovač hoření je společně s dalšími látkami jako například tetrabrombisfenol A diallyl ether jednou z variací na známější tetrabrombisfenol A. Je to bílá látka s teplotou tání kolem 95 °C, rozpustností ve vodě $1,6 \times 10^{-7}$ g/l a rozdělovacími koeficienty $\log P_{ow} = 10,422$ a $\log K_{oc} = 7$ (Harju et al., 2009). TBBPA-DBPE je vyráběn pod různými obchodními názvy jako například SAYTEX HP-800A nebo PE-68 a využívá se jako zpomalovač hoření do HIPS, polypropylenu a dalších polymerů. Produkce této látky byla v Číně 4000 tun v roce 2006 a produkce ve Spojených státech ve stejném roce se přibližovala 4500 tunám (Covaci et al., 2011).

Tento zpomalovač hoření byl detekován v prachu odebraném poblíž rybníční soustavy v Německu a to v koncentraci 1300 ng/g suché váhy (Sawal et al., 2008). Jiná čínská studie detekovala TBBPA-DBPE ve většině environmentálních vzorcích odebraných poblíž Hong Kongu v jižní Číně. Naměřené koncentrace se pohybovaly v rozmezí od <1,5 do 2300 ng/g pro sediment z říční delty, od 131 do 1240 pg/m³ pro ovzduší, od 238 do 8946 ng/g suché váhy pro kal z čistírny odpadních vod a od 17,3 do 60,4 ng/g pro zemědělskou půdu (Shi et al., 2009).

Biodegradační testy ukázaly, že TBBPA-DBPE nemusí být snadno biologicky rozložitelný (WHO, 1995). Experimentální studie alkalické hydrolýzy různých polutantů ukázala, že tato látka je citlivá k hydrolýze podobně jako DDT s poločasem rozkladu menším než 0,02 hodin při teplotě 273 K (Rahm et al., 2005).

Studie zabývající se metabolismem této látky v tělech krys (Fischer-344) ukázala, že TBBPA-DBPE nebývá metabolicky přeměňován. Také bylo zjištěno, že po orálním podání je jen málo této látky absorbováno v těle s poločasem absorpce 2,5 hodin. Na druhou stranu

eliminace z těla je relativně časově dlouhá (13,9 hodin) (Knudsen et al., 2007). Ve stejné studii bylo rovněž ukázáno, že tato látka se nejvíce kumuluje v játrech.

TBBPA-DBPE není příliš akutně toxický. LD₅₀ pro myši byla určena větší než 20 g/kg při orálním i dermálním podání. Nebyly přitom pozorovány žádné abnormální symptomy ani smrt (WHO, 1995). Nebyla detekována žádná indukce cytochromu P450 1A1 v testech *in vitro* a také nebyla pozorována žádná indukce produkce α řetězce receptoru IL-2 (Pullen et al., 2003). Byly prováděny testy na mutagenitu pomocí *Salmonella typhimurium* kmeny TA100 a TA1535. Výsledky ukázaly mutagenní aktivitu této látky a to v přítomnosti i bez metabolické aktivace. Dále byly zjištěny pozitivní výsledky na mutagenitu u kmene TA98 bez přítomnosti metabolické aktivace. Výsledky naznačují, že metabolismem vznikají méně mutagenní látky (Haneke, 2002b). Nebyly pozorovány žádné endokrinní účinky TBBPA-DBPE v testech založených na enzymech aromatázách (CYP19 nebo CYP17) u buněk H295R kůry nadledvinek (Cantón et al., 2005). Rovněž nebyly nalezeny žádné účinky TBBPA-DBPE na AhR, androgenní receptor, progesteronový receptor a estrogení receptor. Na druhou stranu TBBPA-DBPE má vysokou schopnost inhibovat estradiol sulfotransferázu a také dokáže soutěžit s tyroxinem o vazebné místo na proteinu transthyretrin. Tato schopnost je podobná jako u tetrabrombisfenolu A, ale mnohem nižší (Hamers et al., 2006)

TBBPA-DBPE patří k novým bromovaným zpomalovačům hoření. Jen málo vědeckých prací se touto látkou zabývá hlavně v oblastech přítomnosti v životním prostředí a možné biologické rozložitelnosti, a proto je třeba dalšího výzkumu v těchto oblastech.

1.3. Ligninolytické houby a jejich potenciál k degradaci organických polutantů

Houby bílé hniloby (ligninolytické houby) jsou organismy rostoucí na dřevě. Produkují tzv. ligninolytické enzymy, které jim umožňují rozkládat polymerní molekulu ligninu. Tím se pro tyto organismy zpřístupní celulósa a hemicelulósa, které mohou využívat jako zdroj uhlíku a energie. Většina těchto hub patří mezi basidiomycety. Hlavními zástupci ligninolytických hub jsou rody *Bjerkandera*, *Dichomitus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus* a *Trametes*. Po rozkladu ligninu těmito houbami zůstává bíle zbarvená celulósa, podle čehož jsou pak tyto houby pojmenovány jako houby bílé hniloby (Linhartová, 2010).

Tyto houby vylučují jeden nebo více extracelulárních enzymů nezbytných pro odbourávání ligninu. Často jsou tyto enzymy označovány jako lignin modifikující enzymy. Mezi tyto enzymy patří lignin peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14), mangan dependentní

peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13) a versatilní peroxidasa (VP; 1.11.1.16) a měď obsahující fenoloxidasa, lakasa (EC 1.10.3.2). Někteří autoři také popisují mangan independentní aktivity některých hub (Pointing, 2001). Tyto enzymy podílející se na degradaci ligninu mají velmi nízkou substrátovou specifitu. Následkem toho je skutečnost, že tyto enzymy jsou schopny *in vitro* transformace nebo mineralizace široké škály těžko odbouratelných organických polutantů. To je velmi pozoruhodné, protože mnoho z těchto cizorodých látek se nikdy předtím nevyskytovalo v životním prostředí, a tak s nimi nemohly přijít do styku tyto houby. V mnoha případech (například polycyklické uhlovodíky s více jak čtyřmi benzenovými kruhy) jsou houby bílé hniloby jediným organismem schopným jejich rozkladu (Pointing, 2001).

V současné době existují práce popisující degradaci endokrinních disruptorů (Křesinová et al., 2009; Cajthaml et al., 2009), polycyklických aromatických uhlovodíků (Bhatt et al., 2002; Cajthaml et al., 2008), trinitrotoluenu (Spiker et al., 1992) i polychlorovaných bifenylovů (Linhartová, 2010) ligninolytickými houbami a jejich enzymy.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- Zjistit estrogenní a androgenní (případně antiestrogenní a antiantrogenní) působení nových BFR pomocí *in vitro* testů.
- Zjistit možný rozklad nových BFR pomocí vybraných zástupců ligninolytických hub v tekutém médiu *in vitro*.
- Zavést analytické metody pro stanovení vybraných BFR

3. Materiály a metody

3.1. Přehled experimentu

3.1.1. Hormonální aktivity nových bromovaných zpomalovačů hoření

Hormonální aktivity byly zjišťovány pomocí dvou testů užívajících rekombinantní kmeny *Saccharomyces cerevisiae*. Nejdříve byly testovány nejvyšší použitelné koncentrace jednotlivých látek a u těch látek, kde byl zaznamenán efekt, byla testována koncentrační řada

3.1.1.1. β -galaktázový test

Tento test byl vyvinut a poprvé popsán v článku od autorů Routledgeho a Sumplera (1996). Autoři integrovali DNA sekvenci pro lidský estrogení receptor do chromosomu kvasinky. Také byl přidán plasmid, který může nést estrogení receptor, a po aktivaci tohoto receptoru se spustí exprese vedoucí k produkci β -galaktázy. β -galaktáza je následně vylučována do media, kde metabolizuje chlorfenol red- β -D-galaktopyranosidázu (CPRG) na červený produkt, který může být stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm (Routledge a Sumpter, 1996).

3.1.1.2. Bioluminescentní estrogení a androgení test

Tento test byl vyvinut a poprvé popsán v článku autorů Leskinen et al. (2005). Jedná se opět o kvasinkový test s integrovaným receptorem pro lidský estrogení a androgení receptor kmeny BMAEReluc/ER α a BMAEReluc/AR. Společně s nimi je do testu zahrnut i kontrolní kmen na cytotoxicitu přidávaných látek BMA64luc. Po vystavení hormonálně aktivním látkám kvasinky produkují luciferázu, která s luciferinem v mediu vytváří světlo následně měřené na luminometru.

3.1.2. Biodegradační experiment

Pro biodegradační pokus byly vybrány následující houby bílé hniloby: *Trametes Versicolor* (T. VER), *Bjerkandera Adusta* (B. ADUS), *Irpex lacteus* (I. LACT), *Pleurotus ostreatus* (P. OST), *Phanerochaete chrysosporium* (P. CHRYS), *Dichomitus squalens* (D. SQUA) a také dvě půdní houby: *Setulipes androsaceus* (SETUL) a kmen PL13. Ligninolytické houby byly vybrány hlavně z důvodu toho, že jsou velice účinné při degradacích nejrozličnějších organických polutantů. Každá houba degradovala v živném mediu vždy směsný vzorek, ve kterém byly látky: 1,2-bis(2,4,6-tribromfenoxy) ethane, bis(2-ethylhexyl) tetrabromftalát, anhydrid kyseliny tetrabromftalové, 2,3,4,5,6-pentabrommethylbenzen, 2,3,4,5,6-

pentabromtoluen, hexabrombenzen, 2-allyloxy-1,3,5-tribrombenzen, pentabrombenzyl akrylát, 2,4,6-tribromfenol a dekabrombifenyl.

3.1.3. Zavedení analytické metody pro vybrané BFR

Byla zvolena metoda plynové chromatografie s hmotnostním detektorem (GC/MS) na stanovení vybraných zpomalovačů hoření. Jelikož existuje jen několik studií zabývajících se těmito látkami a užívajících GC/MS, bylo nutné vytvořit novou metodu, která by dokázala separovat všechny zkoumané látky. Žádná předchozí studie dosud neanalyzovala všechny zkoumané látky v jednom vzorku.

3.2. Chemikálie a použité mikroorganismy

Bis(2-ethylhexyl) tetrabromftalát (99,5%, GC/MS), dekabrombifenyl (N/A), 1,2-bis(2,4,6-tribromfenoxy) ethan (N/A) a pentabromtoluen byly pořízeny od firmy AccuStandard (USA). 2,3,4,5,6-pentabrommethylbenzen (98%) a tetrabrombisfenol A bis(dibrompropyl ether) (99%) byly pořízeny od firmy Dr. Ehrenstorfer (Německo). Následující chemikálie byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Německo): anhydrid kyseliny tetrabromftalové (98%), 2,4,6-tribromfenol (99%), hexabrombenzen (98%), hexachlorbenzen (98%), pentabrombenzyl akrylát (98%), 2-allyloxy-1,3,5-tribrombenzen (98%), testosteron ($\geq 99\%$), 17β -estradiol (E2, 98%), dimethyl sulfoxid (DMSO, $\geq 99,9\%$), pyridine ($\geq 99,9\%$ for HPLC) a BSTFA + TMCS, 99:1.

Ethylacetát (EtAc, for HPLC) byl zakoupen od firmy Chromservis. Malt extrakt byl zakoupen od firmy Oxoid (Velká británie). Diazomethan byl připraven podle návodu uvedeném v přílohách.

Následující chemikálie na media byly pořízeny od firmy Fluka (Švýcarsko): L-histidin ($\geq 99\%$), adenin ($\geq 99\%$, HPLC), L-lysin-HCl ($\geq 99\%$), L-serin ($\geq 99\%$), thiamin (N/A), inositol (N/A), biotin ($\geq 99\%$) a D-glukóza ($\geq 99\%$, HPLC). Následující chemikálie byly zas pořízeny od firmy Roth (Německo): L-leucin ($\geq 98,5\%$), L-methionin ($\geq 99\%$), L-isoleucin ($\geq 98,5\%$) a L-fenylalanin (N/A). Následující chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Německo): L-arginin-HCl ($\geq 98\%$), L-tyrosin (N/A), L-glutamová kyselina ($\geq 99\%$), L-valin ($\geq 98\%$), L-aspartová kyselina ($\geq 98\%$), L-threonin ($\geq 98\%$), adenin hemisulfát ($\geq 99\%$), tryptofan ($\geq 98\%$), Citrát trisodný (N/A), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (99%), KOH ($> 85\%$), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (N/A), Pantothemová kyselina (N/A), CuSO_4 (N/A) a luciferin (N/A). KH_2PO_4 ($> 99\%$), MgSO_4 (P.A.) a kyselina citronová (P.A.) byly pořízeny od firmy Lachema, Neratovice (Česká

republika). Nitrogen base (N/A) byl pořízen od firmy Difco laboratories, Detroit (USA) a pyridoxin (N/A) byl pořízen od Ústředního skladu ministerstva zdravotnictví, Praha (ČR).

Saccharomyces cerevisiae pro β -galaktázový test byly pořízeny z Laboratoře molekulární buněčné fyziologie a endokrinologie, Dresden University of Technology, Německo. *Saccharomyces cerevisiae* kmeny BMAEReluc/ER α , BMAEReluc/AR a BMA64luc byly dodány od Piia Leskinen, Oddělení biochemie, University of Turku, Finsko.

Irpex lacteus 617/93, *Bjerkandera adusta* 606/93, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446, *Pleurotus ostreatus* 3004 CCBAS 278, *Trametes versicolor* 167/93, *Dichomitus squalens* CCBAS 750, *Setulipes androsaceus* NK 07 byly použity ze sbírky basidiomycet akademie věd (CCBAS). Houba nesoucí označení PL13 byla izolována z environmentálního vzorku opadanky v Xaverově.

3.3. Přístrojové vybavení

Luminometr Lumino-M90a (ZD Dolní Újezd, Česká republika)

Autokláv Falcon LTE Scientific LTD, Velká Británie

Spektrofotometr SPECTRAMax PLUS Molecular Devices, USA

Vakuová odparka RVO 200 A INGOS, ČR

Plynový chromatograf 450-GC Varian, USA

Hmotnostní detektor 240-MS Varian, USA

Autosampler CP-840 Varian, USA

Homogenizátor Ultra-Turrax T25 Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Německo

HPLC Autosampler 465, BIO-TEK Instruments

HPLC Systém 522, BIO-TEK Instruments

HPLC Diore Array Detektor 540+, BIO-TEK Instruments

Třepačka LT 2 Sklářny Kavalier, Závod Votice, ČSR

Třepačka Orbital shaker OS-10 Biosan, USA

3.4. Použité metody

3.4.1. Kvasinkové testy

Jednotlivé bromované zpomalovače hoření byly nejprve za pomoci ultrazvuku rozpuštěny v DMSO a následně naředěny do koncentračních řad pomocí 30% DMSO. Z těchto roztoků bylo odebíráno potřebné množství na příslušné testy.

Pro β -galaktázový test byla použita stejná metoda jako je popisovaná v článku autorů Routledge a Sumpter, 1996. Z chemikálií byly připraveny zásobní roztoky minimálního média a vitamínový roztok, jejichž složení je uvedeno v tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3

Složení zásobního roztoku minimálního média	
KH ₂ PO ₄	13,61 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
KOH	4,2 g
MgSO ₄	0,2 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃ (roztok 40mg/50ml)	1 ml
L-leucin	50 mg
L-histidin	50 mg
adenin	50 mg
L-arginin-HCl	20 mg
L-methionin	20 mg
L-tyrosin	30 mg
L-isoleucin	30 mg
L-lysin-HCl	30 mg
L-fenylalanin	25 mg
L-glutamová kyselina	100 mg
L-valin	150 mg
L-serin	375 mg
vše rozpuštěno v 1 litru deionizované vody	

Tabulka 4

Složení zásobního vitamínového roztoku	
thiamin	8 mg
pyridoxin	8 mg
Pantothemová kyselina	8 mg
inositol	40 mg
biotin (roztok 2mg/100ml)	20 ml
vše rozpuštěno v 180 ml deionizované vody	

Roztok minimálního média byl ihned po namíchání sterilizován v autoklávu a uchováván při pokojové teplotě. Vitamínový roztok byl sterilizován filtrací (0,2 μ m) a uchováván v lednici při teplotě 4 °C. Rovněž byl připraven zásobní roztok D-glukózy (20%), který byl ihned sterilizován v autoklávu a uchováván při pokojové teplotě. Byl připraven také zásobní roztok L-aspartové kyseliny o koncentraci 4 mg/ml. Tento zásobní roztok byl také sterilizován v autoklávu a uchováván při pokojové teplotě. Poté byl připraven zásobní roztok L-threoninu o koncentraci 24 mg/ml, sterilizován v autoklávu a uchováván v lednici při teplotě 4 °C. Také byl připraven zásobní roztok CuSO₄ o koncentraci 20 mM, sterilizován filtrací (0,2 μ m) a uchováván při pokojové teplotě. Na všechny tyto zásobní roztoky byla použita deionizovaná

voda. Na závěr byl připraven zásobní roztok CPRG o koncentraci 10 mg/ml ve sterilní deionizované vodě, který byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C. Není-li uvedeno jinak, probíhaly veškeré sterilizační procesy v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 10 minut.

Ze zásobních roztoků bylo do sterilní nádoby připraveno finální médium podle návodu uvedeným v tabulce 5.

Tabulka 5

Složení finálního kvasinkového media	
zásobní roztok glukózy	5 ml
zásobní roztok minimálního média	45 ml
zásobní roztok L-aspartové kyseliny	1,25 ml
zásobní vitamínový roztok	0,5 ml
zásobní roztok L-threoninu	0,4 ml
zásobní roztok CuSO ₄	0,125 ml

Z tohoto finálního kvasinkového media se odebrala část (10 až 15 ml), která byla zaočkována kvasinkou. Absorbance této kultury při 640 nm by neměla přesáhnout 0,08. Medium s kvasinkou se nechalo v erlenmayerové baňce při teplotě 28 °C za stálého míchání (200 rpm) dokud nebylo dosaženo absorbance alespoň 0,9 při 640 nm, což obvykle trvalo přes noc. Absorbance při 640 nm dává informaci o růstu kvasinkové kultury. Následně se připravilo další medium smícháním 0,5 ml zásobního roztoku CPRG s 50 ml finálního kvasinkového media. Do tohoto media bylo dáno 2 ml z media s rostoucí kvasinkou, čímž vznikla výsledná měřicí kultura.

Tato výsledná měřicí kultura kvasinek byla dána do jednotlivých jamek mikrodestičky (v každé jamce 180 µl). Do jamek bylo přidáno také 20 µl příslušného roztoku zkoumané chemické látky. Mikrodestička byla zamíchána, zalepena autoklávovací páskou a nechána při teplotě 28 °C 2 až 3 dny. Po prvním dni byla destička opět zamíchána. Po dvou (případně třech) dnech bylo zabarvení jednotlivých jamek změřeno na spektrofotometru při vlnových délkách 540 a 620 nm. Absorbance při 540 nm je úměrná množství rozloženého CPRG a tedy i aktivaci estrogenního receptoru. Absorbance při 620 nm dává informaci o hustotě kvasinkové kultury. Jednu takovou destičku je možno vidět na obrázku 1 v přílohách.

Při zjišťování antiestrogenní aktivity bylo nejprve do jamek mikrodestičky přidáno 20 µl roztoku 17β-estradiolu o koncentraci 10 µg/l v ethanolu. Ethanol se nechal volně odpařit a pak už bylo pokračováno stejně jako při estrogenním pokusu. Tento krok zajistil výslednou koncentraci 17β-estradiolu 1 µg/l v každé jamce a současně nezvýšil koncentraci DMSO, ve kterém se přidávaly zkoumané látky. Tato koncentrace 17β-estradiolu byla zvolena z toho důvodu, protože při ní dosahuje zmíněný hormon své maximální odezvy v tomto testu.

Pro bioluminescentní test byla použita obdobná metoda popisovaná v článku od Leskinen et al. (2005) pouze s drobnými rozdíly. Nejprve byl připraven zásobní roztok dusíkaté báze rozpuštěním 6,7 g nitrogen base v 910 ml deionizované vody. Tento zásobní roztok byl sterilizován v autoklávu a uchováván v lednici při teplotě 4 °C. Dále byl připraven zásobní roztok D-glukózy (40g/100ml), zásobní roztok L-histidinu o koncentraci 2 g/l, zásobní roztok adenin hemisulfátu o koncentraci 5 g/l, zásobní roztok L-leucinu o koncentraci 10 g/l a zásobní roztok tryptofanu o koncentraci 2 g/l. Na všechny tyto zásobní roztoky byla použita deionizovaná voda. Roztok glukózy byl sterilizován v autoklávu a roztoky aminokyselin byly sterilizovány filtrací (0,2 µm). Všechny tyto zásobní roztoky byly uchovávány při pokojové teplotě krom roztoku tryptofanu, který byl v lednici při teplotě 4 °C. Ze zásobních roztoků bylo namícháno výsledné luc minimální médium podle návodu uvedeným v tabulce 6.

Tabulka 6

Složení výsledného luc minimálního média	
zásobní roztok glukózy	5 ml
zásobní roztok dusíkaté báze	91 ml
zásobní roztok L-histidinu	1 ml
zásobní roztok adenin hemisulfátu	1 ml
zásobní roztok L-leucinu	1 ml

Uvedené luc minimální médium bylo použito pro kmeny kvasinek BMAEReluc/ERα a BMAEReluc/AR. Pro kmen BMA64luc bylo do výsledného minimálního média přidáno i 1 ml zásobního roztoku tryptofanu.

Také byl namíchán zásobní roztok luciferinu o koncentraci 2 mM. Luciferin byl rozpuštěn v citrátovém pufru, který se připravil smícháním 35 ml 0,2 M roztoku kyseliny citronové a 65 ml 0,2 M roztoku citrátu sodného. Roztok luciferinu o koncentraci 2 mM byl uchováván v mrazáku při -20 °C a před měřením na luminometru byl zředěn na koncentraci 1 mM.

4 ml výsledného luc minimálního média bylo ve sterilní zkumavce zaočkováno příslušnou kvasinkou a necháno přes noc při teplotě 30 °C. Další den byl obsah zkumavky ve sterilní erlenmayerovy baňce zředěn čerstvým luc minimálním médiem na dosažení absorbance 0,4 při 600 nm. Medium s kvasinkou se nechalo zhruba 2 hodiny při teplotě 30 °C, dokud nebylo dosaženo absorbance alespoň 0,6 při 600 nm. Zkumavky pro luminometr se nejprve vypláchly ethanolem (kvůli sterilizaci) a nechaly vyschnout a poté bylo do každé přidáno 20 µl zkoumané látky a 200 µl rostoucí kvasinkové kultury. Zkumavky byly zalepeny

parafilmem a znova inkubovány při teplotě 30 °C alespoň 2,5 hodin. Poté byly zamíchány a těsně před měřením bylo přidáno 150 µl roztoku luciferinu (1 mM). Měření každé zkumavky na luminometru probíhalo po dobu 60 sekund. U kontrolního kmenu (BMA64luc) se přidávalo jen 10 µl zkoumané látky na 100 µl rostoucího media a následně se přidávalo 100 µl roztoku luciferinu (1 mM).

Pro antiestrogenní a antiandrogenní testy bylo do zkumavky společně s látkami přidáno i 20 µl roztoku 17β-estradiolu případně testosteronu o koncentraci 100 µg/l v 30% DMSO. Tento přídatek zajistil výslednou koncentraci příslušného hormonu 8,33 µg/l. Tato koncentrace byla použita z toho důvodu, protože při ní mají zmíněné hormony svoji maximální odezvu v daném testu.

3.4.2. Biodegradační test

Jednotlivé bromované zpomalovače hoření byly nejprve rozpuštěny v DMSO a poté byl z těchto roztoků namíchán směsný roztok zkoumaných BFR. V tomto roztoku měly všechny BFR přibližnou koncentraci 99 mg/l. Z tohoto zásobního roztoku se odebíralo potřebné množství na degradační pokus.

Samotný degradační experiment používal obdobnou metodu jako už dříve provedená práce Cajthaml et al. (2009). Malt extrakt-glukózové medium (5 g malt extrakt a 10 g glukózy na 1 l vody) bylo dáno do erlenmayerových baněk vždy po 20 ml a sterilizováno v autoklávu. Následně bylo medium zaočkováno příslušnou houbou a necháno 1 týden při teplotě 28 °C. Zaočkování spočívalo ve vyříznutí agarového disku z petriho misky porostlé houbovou kulturou a vložení tohoto disku do baňky. Po uplynutí jednoho týdne bylo mycelium v baňce homogenizováno (s užitím Ultra-Turrax) a 1 ml této suspenze byl použit na zaočkování čerstvé baňky také s 20 ml sterilního media. Do těchto baněk, zaočkovaných příslušnou houbou, bylo přidáno 200 µl ze zásobního roztoku zkoumaných látek. Výsledná koncentrace jednotlivých BFR v baňkách byla 0,94 mg/l. Baňky byly následně nechány 7 a 22 dní při teplotě 28 °C. Experiment s každou houbou byl proveden ve třech paralelách pro oba časové úseky. Do experimentu byla zahrnuta také abiotická kontrola, která spočívala v autoklávem zabité houbě po jednom týdnu růstu, do které bylo přidáno stejné množství zkoumaných látek jako do pokusu. Tato mrtvá kontrola byla provedena ve třech paralelách se stejnými časovými úseky jako degradační experiment. Ukázku z degradačního pokusu je možno vidět na obrázku 2 v přílohách.

Po uplynutí degradační doby bylo mycelium v baňkách homogenizováno. Následně bylo přidáno 200 µl 1M HCl a 20 ml ethylacetátu (EtAc). Celý obsah se převedl do

uzavíratelné baňky se šroubovým uzávěrem a teflonovým těsněním, která se nejprve umístila na třepačku po dobu 20 minut a poté do ultrazvukové lázně. Horní vrstva ethylacetátu byla převedena skleněnou stříkačkou do srdcovky. Postupně se takto opakovalo 5 kroků extrakce pomocí EtAc pouze s tím rozdílem, že v dalších extrakcích bylo přidáváno jen 10 ml ethylacetátu. Před každým přidavkem EtAc byla tímto rozpouštědlem vypláchnuta i erlenmayerova baňka, ve které probíhala degradace. To bylo prováděno z toho důvodu, aby se zamezilo ztrátám způsobeným ulpíváním látek na stěnách baňky. Obsah srdcovky byl zakonzentrován pomocí rotační vakuové odparky při teplotě 40 °C a 800 hPa na přibližný objem 2 ml.

Ethylacetát v srdcovce po odparu byl převeden na kolonku tvořenou 2,5 ml síranu sodného, aby se odstranila zbytková voda ve vzorku. Eluce z kolonky byla prováděna přibližně 10 ml ethylacetátu do předem zvážené vialky. Objem EtAc byl zjištěn výpočtem z rozdílu hmotnosti vialky a hustoty ethylacetátu. Hustota EtAc byla zjištěna experimentálně zvážením pipetou přidaného množství a výpočtem průměru ze čtyř pokusů.

Stanovení koncentrace ve vzorcích bylo prováděno pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem. Bližší informace o měřící metodě jsou uvedeny v jiné kapitole jako součást optimalizace měřící metody pro BFR.

3.4.3. Metoda derivatizace látky 2,4,6-tribromfenol

Jelikož látku 2,4,6-tribromfenol je třeba derivatizovat před měřením na plynové chromatografii, bylo třeba optimalizovat tento krok. Derivatizaci této látky je třeba provádět z důvodu pokrytí funkční skupiny –OH. Byly vyzkoušeny dva postupy derivatizace využívající jiná derivatizační činidla, diazomethan a BSTFA+ TMCS, 99:1.

Na derivatizaci pomocí diazometanu byla použita následující metoda. Do vialky bylo dáno 200 µl vzorku a na stěně vialky se udělala pomocná ryska. Dále bylo přidáno 500 µl diazomethanu a necháno v zakrempované vialce 30 minut. Poté byl diazomethan odpařen pomocí mírného proudu dusíku, až bylo dosaženo objemu, který udávala pomocná ryska. Na závěr byl přidán vnitřní standart na určení objemu (roztok hexachlorbenzenu). Vzorek byl následně měřen na GC/MS.

Na derivatizaci pomocí BSTFA byla použita následující metoda. Bylo dáno 300 µl vzorku + 100 µl pyridinu do krempovací vialky a byla udělána pomocná ryska. Následně se přidalo 300 µl BSTFA + TMCS a zakrempovaná vialka se umístila do 60 °C na dobu 2 hodin. Poté byl obsah vialky odpařen pod mírným proudem dusíku na objem udávaný pomocnou ryskou. Následně bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu (roztok hexachlorbenzenu) a 1100

μl ethylacetátu. Vialky byly zakremповány a měřeny na GC nebo LC. Výťažnost této derivatizace byla zjišťována pomocí kapalinové chromatografie s UV detektorem jako úbytek reagujícího 2,4,6-tribromfenolu. Byla použita mobilní fáze skládající se z 60% acetonitrilu a ze 40% vody, která obsahovala 1% kyseliny octové. TBP byl identifikován pod vlnovou délkou 230 nm.

3.4.4. Zpracování dat

3.4.4.1. Zpracování dat u β-galaktázového testu

U β-galaktázového testu byly naměřené absorbance zpracovány podle vzorce:

$$\text{Korigovaná absorbance} = (A_{540\text{nm}}\text{chemikálie} - A_{620\text{nm}}\text{chemikálie}) - (A_{540\text{nm}}\text{slepý vzorek} - A_{620\text{nm}}\text{slepý vzorek})$$

Kde $A_{540\text{nm}}\text{chemikálie}$ je absorbance vzorku se zkoumanou chemickou látkou při 540 nm.

$A_{620\text{nm}}\text{chemikálie}$ je absorbance vzorku se zkoumanou chemickou látkou při 620 nm

Jako slepé stanovení (blank) bylo použito přidávané 30% DMSO. Všechno měření bylo prováděno ve třech opakováních. Korigované absorbance byly vyneseny v grafu se směrodatnými odchylkami v závislosti na koncentraci zkoumané látky.

Pro antiestrogenní test byl použit stejný vzorec jako výše pouze s tím rozdílem, že korigované absorbance byly vztaženy k hodnotě pro čistý hormon o koncentraci 1 μg/l a vyjádřeny v procentech.

Na zjištění toxicity přidávaných chemikálií pro kvasinky byla použita hodnota spočítaná podle vzorce:

$$\text{Hodnota toxicity} = A_{620\text{nm}}\text{chemikálie} / A_{620\text{nm}}\text{slepého vzorku}$$

Tato hodnota je srovnatelná s korekčním faktorem (CF) z bioluminescentního testu a měla by být v rozmezí 0,5 až 2 podle Leskinen et al., 2005.

3.4.4.2. Zpracování dat z bioluminescentního testu

U bioluminescentního testu byly nejprve integrovány (sečteny) všechny světelné hodnoty z luminometru (RLU) a následně se postupovalo podle vzorce z Leskinen et al. (2005).

$$\text{Fold induction (FI)} = \text{RLU (chemikálie)} / \text{RLU (slepý vzorek)}$$

Kde FI je fold induction zavedená v článku autorů Leskinen et al. (2005). RLU jsou sečtené hodnoty světelné emise z luminometru. Hodnota FI se počítala z hodnot pro kvasinky s estrogenním nebo androgenním receptorem. Dále byl spočítán korekční faktor podle vzorce:

$$\text{Korekční faktor (CF)} = \text{RLU (slepý vzorek)} / \text{RLU (chemikále)}$$

Kde CF je korekční faktor zavedený v článku autorů Leskinen et al. (2005). RLU jsou sečtené hodnoty světelné emise z luminometru. Hodnota CF se počítala z hodnot pro kvasinky kontrolního kmene (BMA64luc). Tento korekční faktor by měl být v rozmezí 0,5 až 2 (Leskinen et al., 2005).

Výsledná opravená hodnota ($FI_{\text{corrected}}$) se spočítala vynásobením FI a CF pro příslušnou chemickou látku.

$$\text{Výsledná opravená hodnota } FI_{\text{corrected}} = FI * CF$$

Jako slepý vzorek bylo použito přidávané 30% DMSO. Všechno měření bylo prováděno v tripletech. Opravené hodnoty byly vyneseny v závislosti na koncentraci přidávané chemikálie do grafů.

Pro antiestrogenní a antiandrogenní bioluminescentní test byl použit stejný vzorec jako výše jen s tím rozdílem, že jako blank byly použity hodnoty, kde bylo přidáváno 20 μ l příslušného hormonu o koncentraci 100 μ g/l a 20 μ l 30% DMSO.

3.4.4.3. Zpracování dat z degradačního pokusu

U degradačního pokusu byla průměrná množství zkoumaných látek vynesena v grafu se směrodatnými odchylkami a porovnána s průměrným množstvím příslušné látky z mrtvé kontroly.

3.4.4.4. Zpracování dat pro statistické vyhodnocení

Pro statistické zpracování a důkazy byl použit volně dostupný program R. Byly použity testy: Jednovýběrový T-test, Welchův dvouvýběrový T-test vždy s jednostrannou alternativou a 5% hladinou ($\alpha = 5\%$) a lineární model regrese opět s 5% hladinou. Jednovýběrový T-test byl použit pro kvasinkové testy z toho důvodu, že při počítání výsledných hodnot z těchto testů se už počítá se slepým stanovením, a tak nezbyvá než porovnat tuto hodnotu s konkrétním

číslem (0 pro β -galaktázový test nebo 1 pro bioluminescentní test). Pro biodegradační test byl použit Welchův dvouvýběrový T-test, kde jako jeden výběr byly vzaty paralely z degradačního pokusu a druhý výběr byly paralely mrtvé kontroly. Jelikož se v řadě případů nepodařilo ověřit shodu rozptylů jednotlivých výběrů, byla použita Welchova korekce.

3.4.4.5. Zpracování dat z plynové chromatografie s hmotnostním detektorem

Pro zpracování chromatogramů z plynové chromatografie byl použit program Varian MS Workstation verze 6.9.1. Chromatogramy byly nejprve vyhlazeny na 5 měřících bodů (5 point smooth) a pak byly postupně filtrovány na ionty pro jednotlivé látky. Ionty pro jednotlivé látky jsou uvedeny v kapitole Optimalizace metody analýzy pro nové BFR. Všechny chromatografické píky byly integrovány ručně.

4. Výsledky

4.1. Rozpustnost zkoumaných látek

Všechny zkoumané BFR byly rozpustny v DMSO až na látku dekabromdifenyl ethan. Tuto látku se nepodařilo rozpustit ani s využitím ultrazvuku, a tak s ní nebyly prováděny testy na hormonální aktivity ani biodegradační test. Rovněž se tuto látku nepodařilo úplně rozpustit v hexanu na koncentraci 2,76 mg/l, a tak ani nebyla optimalizována analytická metoda pro tuto látku.

Pro kvasinkové testy, kde byly látky rozpuštěny v 30% DMSO, byly zjištěny použitelné (dostatečně rozpustné) koncentrace 20 mg/l pro látky ATBB, HBB, PBBA, TBBPA-DBPE, PBEB, PBT, DBB, TBPH, 100 mg/l pro látku BTBPE a 500 mg/l pro látku TBPA. Při vyšších koncentracích docházelo k vysrážení standardů z roztoku.

4.2. Toxické působení přidávaných chemikálií na kvasinky

U β -galaktázového testu při porovnání absorbance 620nm u chemikálie s hodnotou pro blank se vyloučilo toxické působení přidávaných chemikálií na kvasinkovou kulturu. Jedinou výjimku v tomto směru představovala látka TBP, která při nejvyšších přidávaných koncentracích působila toxicky ($A_{620nm} \text{chemikálie} / A_{620nm} \text{blank} = 0,237$ pro koncentraci 20 mg/l). Druhá testovaná koncentrace TBP (10 mg/l) už ale nejevila žádné známky toxicity. U bioluminescentního testu všechny chemikálie měly korekční faktor CF v požadovaném rozmezí (0,5 až 2), a tudíž nebyly toxické pro kvasinky podle Leskinen et al., 2005. Na druhou stranu u antiestrogenního a antiandrogenního pokusu, když se smíchaly přidávané hormony a TBP, bylo zaznamenáno postupné snižování CF s růstem koncentrace TBP. U nejvyšších koncentrací TBP bylo dosaženo hodnot CF 0,368 a 0,461, což značí cytotoxické působení. U nižších koncentrací už však byly korekční faktory v požadovaném rozmezí.

4.3. Estrogenní a androgenní aktivity jednotlivých zpomalovačů hoření

Výsledky hormonálních aktivit jsou uvedeny v grafech 1 až 10 v přílohách. V grafu 1 jsou korigované absorbance z β -galaktázového testu pro nejvyšší rozpustné koncentrace jednotlivých látek. Látka TBP byla aplikována i ve vyšších koncentracích než je uvedeno, ale při vyšších koncentracích působí silně toxicky pro kvasinky. Z grafu je patrné, že žádná látka nevykazuje estrogenní aktivitu krom látky PBBA. Tato látka však vykazuje pouze velmi nízkou aktivitu při porovnání s přirozeným hormonem (17β -estradiolem), nicméně při

statistickém zpracování byl na 5% hladině prokázán estrogenní efekt této látky. Pro představu je uveden graf odpovědi 17 β -estradiolu v tomto testu v závislosti na koncentraci (graf 2).

Estrogenní aktivita byla rovněž sledována pomocí bioluminescentního testu. Graf 3 ukazuje $FI_{corrected}$ opět pro nejvyšší koncentrace zkoumaných látek. Z grafu je patrné, že hodnoty $FI_{corrected}$ všech látek se pohybovaly okolo jedné, což znamená žádnou estrogenní aktivitu. To bylo ověřeno i statistickým zpracováním, kde na 5% hladině nebylo prokázáno zvýšení estrogenní aktivity žádné látky.

Rovněž byly měřeny androgenní aktivity bioluminescentním testem. V Grafu 4 jsou uvedeny opět spočtené hodnoty $FI_{corrected}$ pro nejvyšší měřené koncentrace jednotlivých látek. Z grafu je vidět, že žádná látka nevykázala androgenní aktivitu krom látek DBB a TBPH, a to ovšem pouze velmi slabou. Statisticky významnou se podařilo prokázat androgenní aktivitu pouze u látky TBPH ($p < 0,05$).

Při měření antagonistických efektů na estrogenní receptor vykazalo více látek antihormonální efekt. V grafu 5 je možno vidět $FI_{corrected}$ pro nejvyšší měřené koncentrace jednotlivých látek u bioluminescentního antiestrogenního pokusu. Z grafu je patrné, že některé látky mají antiestrogenní efekt. Největší antagonistický efekt ukázala látka TBP, která inhibovala činnost hormonu až o 95,5%. I další látky také působily antiestrogenně. Látky PBBA, PBEB, BTBPE, PBT a DBB vykazaly příslušné snížení aktivity hormonu o 25%, 20%, 31%, 14% a 12%. U všech těchto látek byl antihormonální efekt statisticky průkazný ($p < 0,05$). U látky TBP byl proveden další test, jehož výsledky je možno vidět v grafu 6. V tomto grafu je patrné snižování hormonální aktivity s růstem koncentrace TBP. Tato koncentrační závislost je i statisticky průkazná ($p < 0,05$, $R^2 = 0,993$). Byla spočítána hodnota IC_{50} na 4,66 mg/l pro TBP. U ostatních látek nebylo možné prokázat koncentrační závislost ani spočítat hodnoty IC_{50} , jelikož použitý test není dostatečně citlivý a zkoumané látky nejsou rozpustné při vyšších koncentracích.

Antiestrogenní aktivity byly zjišťovány také β -galaktázovým testem. Výsledky tohoto pokusu pro všechny látky jsou uvedeny v grafu 7. Z grafu je vidět, že žádná látka krom TBP a BTBPE nevykázala výraznější antiestrogenní efekt. Inhibice hormonální aktivity byla 12,2 % u látky BTBPE a 96,5% u látky TBP. Pro obě tyto látky byly antihormonální efekty statisticky průkazné ($p < 0,05$). V grafu 8 je pak možno vidět závislost inhibice receptoru na koncentraci TBP a BTBPE. Tato koncentrační závislost je pro TBP také statisticky průkazná ($p < 0,05$). Hodnota IC_{50} pro TBP byla stanovena na 3,04 mg/l.

Výsledky antiandrogenního bioluminescentního testu pro všechny zkoumané látky jsou uvedeny v grafu 9. Z grafu je patrné, že látka TBP vykazovala snížení hormonální aktivity

až o více jak 99%. Také látka PBBA měla antiandrogenní efekt s poklesem hormonální aktivity o 25,5%. U obou těchto látek byl tento efekt statisticky významný ($p < 0,05$). Ostatní látky neměly žádné antiandrogenní efekty nebo jen velmi malé. V grafu 10 je uvedeno postupné snižování hormonální aktivity v závislosti na koncentraci TBP. Je zde patrná koncentrační závislost, která byla i statisticky průkazná ($p < 0,05$). Byla spočítána pro tuto látku hodnota $IC_{50} = 1,3$ mg/l.

4.4. Biodegradační pokus s ligninolytickými houbami

Výsledky pro degradační pokus jsou uvedeny v grafech 11 až 19 v přílohách. Z grafů je patrné, že látky TBP, ATBB a PBBA byly výrazně rozkládány téměř všemi houbami. Látka TBP se zdá být nejsnáze degradovatelná. Všechny houby odbouraly tuto látku v průměru o 94,8% už po 7 dnech trvání pokusu. Tyto rozdíly po 7 dnech byly i statisticky významné ($p < 0,05$). Po 22 dnech byl stanoven úbytek této látky od 97,8% do 92,8%. Jako nejlepší houbou pro degradaci této látky se jeví *Irpex lacteus*, který vykázal degradaci TBP o 97,5% už po 7 dnech a o 97,8% po 22 dnech. Látka PBBA byla také dobře odbourávána všemi houbami. Všechny houby degradovaly tuto látku v průměru o 80,1% po 7 dnech a o 90,5% po 22 dnech trvání pokusu. Rozdíly oproti mrtvé kontrole byly vždy statisticky významné ($p < 0,05$). Jako nejlepší houba se opět jeví *Irpex lacteus*, která degradovala 92,2% PBBA po 7 dnech a 94,7% po 22 dnech trvání pokusu. Houba *Setulipes androsaceus* vykázala nejpomalejší rozklad této látky, kde po 7 dnech bylo rozloženo 53,1% a po 22 dnech 80,2%. ATBB je třetí látkou, u které byl zaznamenán výrazný úbytek. Všechny houby krom *Setulipes androsaceus* degradovaly tuto látku v průměru o 68% po 7 dnech a o 86,5% po 22 dnech. Opět i zde byly rozdíly oproti kontrole statisticky významné ($p < 0,05$). Jako nejlepšími degradátory této látky se ukázaly houby *Irpex lacteus* a *Bjerkandera adusta*, které vykázaly úbytek ATBB o 88,88% a 88,7% po 7 dnech a o 91,17% a 91,8% po 22 dnech. U houby *Setulipes androsaceus* nebyl zaznamenán žádný úbytek látky ATBB během degradačního pokusu.

U ostatních látek nebyl zaznamenán výraznější úbytek během pokusu. U látek TBPH a BTBPE nebyla zaznamenána žádná degradace během celého experimentu. Látka PBEB také nevykázala výraznější úbytek, ale jen velmi malý, který nebyl statisticky významný krom houby *Pleurotus ostreatus*. Tato houba degradovala 35,7% PBEB po 22 dnech. Látky HBB a PBT také nevykázaly výraznější degradaci. Úbytek těchto látek byl od 5,4% do 31,5% pro HBB a od 6,4% do 31,9% pro PBT po 22 dnech inkubace. Degradace u látek HBB a PBT

nebyla statisticky průkazná u žádné houby. Látka DBB podobně jako TBPH a BTBPE neukázala po 7 ani 22 dnech degračního pokusu žádný výraznější úbytek.

4.5. Optimalizace metody analýzy pro nové BFR

4.5.1. Derivatizace látky 2,4,6-tribromfenol

Při derivatizaci pomocí diazomethanu bylo zjištěno, že touto metodou vznikají i jiné bromované látky a ne jenom žádaný 2,4,6-tribromanisol (produkt methylace 2,4,6-tribromfenolu). Tyto vedlejší produkty derivatizace byly nalezeny pomocí GC/MS použitím filtrace na ionty bromu 79 a 81. Vznikající 2,4,6-tribromanisol byl stanovován pomocí filtrace chromatogramu na ionty 346, 344, 329, 331 a porovnáván se standardem o žádané koncentraci. Některé z vedlejších produktů dokonce vznikaly ve větší míře než 2,4,6-tribromanisol, a tak nikdy nebylo dosaženo vyšší účinnosti než 50%. Metoda derivatizace byla vyzkoušena i s různými přídávky diazomethanu a různými časy reakce, ale výsledky nikdy nepřinesly většinovou produkci 2,4,6-tribromanisolu.

Při derivatizaci pomocí BSTFA bylo zjištěno, že tato metoda je vhodná pro derivatizaci TBP. Byly vyzkoušeny také různé modifikace prováděné metody jako například úprava teploty a délky reakce, množství přidávaného pyridinu a množství přidávaného BSTFA. Nejlepších výsledků, tedy úbytek reagujícího TBP, bylo dosaženo při následujících podmínkách: 300 µl přidávaného BSTFA a 100 µl přidávaného pyridinu na 300 µl vzorku, reakce po dobu 2 hodin při 60 °C. Při těchto podmínkách bylo dosaženo v průměru 90% výtěžnosti derivatizace TBP.

4.5.2. Metoda analýzy nových bromovaných zpomalovačů hoření na plynové chromatografii

Po několika pokusech s postupně se zrychlujícími teplotními gradienty se dospělo k podmínkám uvedeným v tabulce 7.

Tabulka 7

Měřicí metoda na plynové chromatografii		
použitá kolona	Restek, Rxi-5Sil MS, 15 metrů, 0,25 mmID, 0,25 µm df	
jehla		
velikost jehly	10 µl	
objem opachu	5 µl	
rychlost nasávání	5 µl/sek	
předoplach rozpouštědlem	5x	
předoplach vzorkem	1x	
postoplach rozpouštědlem	5x	
objem na nástřik	1 µl	
injektor		
typ injektoru	1177	
teplota injektoru	250 °C	
průtok kolonou	1 ml/min	
teplotní režim kolony	počátek při 60 °C po dobu 1 min růst teploty na 250 °C rychlostí 20 °C/min růst teploty na 300 °C rychlostí 5 °C/min držení teploty 300 °C po dobu 20 min	
hmotnostní detektor		
průměrované mikroměření	2	
mód měření	fast	
segmenty měření	časový úsek	ionty
	0 - 7,1 min	vypnuto
	7,1 - 9,0	208 - 335 m/z
	9,0 - 10,5	485 - 510 m/z
	10,5 - 12,0	548 - 555 m/z
	12,0 - 14,9	450 - 485 m/z
	14,9 - 17,0	vypnuto
	17,0 - 18,5	325 - 365 m/z
	18,5 - 21,9	450 - 475 m/z
	21,9 - 27,0	450 - 475 m/z
	27,0 - 28,89	390 - 400 m/z
	28,89 - 40,0	vypnuto

Pro látku TBP byla použita obdobná metoda pouze s tím rozdílem, že segment v čase 7,1 až 9,0 sledoval ionty v rozsahu 220 až 410. Tato látka byla analyzována samostatně. To bylo provedeno z toho důvodu, protože tato látka má po derivatizaci podobný retenční čas jako ATBB. Obě tyto látky však vyžadují jiné ionty pro detekci, a tak tímto zúžením skenovacího rozsahu byla zajištěna dostatečně vysoká frekvence skenování. Při takto nastavených parametrech měření měly všechny segmenty frekvenci skenování ≥ 4 Hz.

Metoda byla vyzkoušena na standardech jednotlivých látek i směsného roztoku. Jako kvantifikační limit byl vzat nejnižší bod kalibrační přímky. Ionty, na které se filtrovaly chromatogramy, a retenční časy pro jednotlivé látky jsou uvedeny v tabulce 8. Na obrázku 3 v přílohách je pak možno vidět ukázkou chromatogramů z dekadačního pokusu.

Tabulka 8

Jednotlivé látky na GC/MS			
látka	ionty, na které bylo filtrováno	retenční čas	limit kvantifikace
2-allyloxy-1,3,5-tribrombenzen (ATBB)	210; 212; 329; 330; 331; 332	7,6	1 ng/ml
Hexabrombenzen (HBB)	551; 552,6; 553,8	10,927	1 ng/ml
Pentabrombenzyl akrylát (PBBA)	475; 477; 479	12,13	10 ng/ml
2,3,4,5,6-pentabromethylbenzen (PBEB)	500; 502; 504; 487; 486	10,27	1 ng/ml
1,2-bis(2,4,6-tribromfenoxy)ethan (BTBPE)	357; 359; 330; 332	17,711	100 ng/ml
2,3,4,5,6-pentabromtoluen (PBT)	487; 488; 490	10,052	1 ng/ml
Dekabrombifenyl (DBB)	391; 392; 393	27,229	100 ng/ml
Bis(2-ethylhexyl) tetrabromftalát (TBPH)	464; 465; 467	18,867	100 ng/ml
2,4,6-tribromfenol (TBP)	388; 389; 391	7,75	1 ng/ml

I přes veškerou snahu se nepodařilo optimalizovat metodu pro látku TBPA. Pro tuto látku se podařilo nalézt odpovídající spektrum a určit retenční čas, který byl 10,92. Hmotnostní spektrum této látky bylo tvořeno převážně ionty 420; 464; 422. Byly však zjištěny podstatně velké rozdíly v odezvách zásobního roztoku. Tyto rozdíly se nepodařilo objasnit, a tak nemohla být vytvořena důvěryhodná kalibrační přímka pro tuto látku. Také pro látku TBBPA-DBPE nebyla optimalizována měřicí metoda, a to z toho důvodu, že při analýze standardu s nejvyšší koncentrací této látky nebyl nalezen žádný chromatografický pík s iontovým spektrem, které by mohlo být přiřazeno k této látce.

Pro ostatní zkoumané látky byly vytvořeny kalibrační přímky uvedené v příloze.

5. Diskuze

5.1. Hormonální aktivity zkoumaných látek

Z naměřených hodnot vyplývá, že látka 2,4,6-tribromfenol má silné antihormonální účinky a to jak antiestrogenní tak antiandrogenní. U těchto antihormonálních účinků můžeme vyloučit, že jsou způsobeny cytotoxickým působením přidávané látky. Jen nejvyšší koncentrace TBP působily toxicky pro kvasinky. I kdybychom vzali jen ty hodnoty u nichž vyloučíme toxické působení, byli bychom schopni stále prokázat jak koncentrační závislost tak samotný antihormonální vliv TBP. Rovněž výsledné hodnoty IC_{50} by se nezměnily.

Pro statistické důkazy byl zvolen jednovýběrový T-test z toho důvodu, že u žádné látky nebylo možné prokázat, že by naměřené hodnoty nesplňovaly normální rozdělení. Lze však předpokládat, že i zvýšení počtu hodnot na více jak tři by nepřineslo změnu rozdělení dat a spíše by se data více přibližovala k normálnímu rozdělení podle centrální limitní věty. Větší počet hodnot pro každou látku by zvýšil sílu testu. I tak se ale podařilo statisticky prokázat vlivy některých látek.

Interakce TBP s androgenním receptorem je už známa z dřívějších vědeckých prací. Larsson et al. (2006) predikoval pomocí modelu, že tato sloučenina se dokáže vázat do aktivního místa androgenního receptoru, ale jelikož je příliš malá, tak nedokáže řádně interagovat s oběma polárními konci na aktivním místě. TBP převážně interaguje se skupinami Asn41 a Thr211, ale není schopen dosáhnout na skupiny Arg88 a Gln 46 a aktivovat tak řádně androgenní receptor. Energie interakce s vazebným místem byla spočítána na 27 – 28 kcal/mol (Larsson et al., 2006). Ve stejné studii byl rovněž prováděn *in vitro* test, ale pouze aktivační, a tak autoři nezjistili antihormonální působení této látky. Jiná studie zabývající se antagonistickým efektem TBP na androgenní receptor udává, že byla sledována antiandrogenní aktivita s $IC_{50} > 15 \mu M$ (Hammers et al., 2006). Tato hodnota IC_{50} byla ovšem získána pouze z jednoho měření a autoři sami uvádějí, že nemohou vyloučit cytotoxicitu, která může způsobovat tento jev. Tato diplomová práce přináší důkazy o antiandrogenním působení TBP s vyloučením cytotoxicity. Toto působení je koncentračně závislé s hodnotou $IC_{50} = 1,3 \text{ mg/l}$, která se však neshoduje s tím, co uvádí Hammers et al. ($IC_{50} > 4,962 \text{ mg/l}$ po přepočtu). Rozdíly ve výsledcích budou zřejmě způsobeny odlišnými *in vitro* testy. Hammers et al. použil CALUX biotest využívající buněčnou linii lidských osteoblastů, kdežto v této práci byl použit kvasinkový biotest. Samotný antiandrogenní efekt TBP bude nejspíše způsoben blokadou vazebného místa androgenního receptoru a znemožněním tak navázání přirozeného hormonu (testosteronu).

Rovněž interakce TBP s estrogenním receptorem byla už zjišťována. Olsen et al. (2002) pozoroval slabou vazbu této látky na estrogenní receptor tím, že došlo k záměně TBP za 17 β -estradiol, avšak neprokázal žádnou aktivaci tohoto receptoru. Rovněž nepozoroval žádný antiestrogenní efekt této látky. Jiná studie pozorovala antiestrogenní efekt TBP a stanovila hodnotu IC₅₀ na 8,3 \pm 1,2 μ M (po přepočtu 274.56 mg/l) (Hammers et al., 2006). Tato hodnota IC₅₀ je velmi vysoká oproti námi získaným hodnotám 4,66 mg/l a 3,04 mg/l u bioluminescentního a β -galaktázového testu. Rozdíly mohou být opět dány jiným použitým testem. Hammers et al. použil pro tento test CALUX biotest využívající linii lidských buněk rakoviny prsu. Přesný mechanismus antiestrogenního působení TBP zůstává nejasný. Může se jednat o blokaci vazebného místa pro hormon, nebo se může tato látka vázat na jiné místo na estrogenním receptoru a způsobovat tak jeho nečinnost.

Rozdíly ve výsledcích hormonálních aktivit z různých biotestů byly už pozorovány dříve. Svobodová et al. (2009) ve své práci pozorovala rozdíly v citlivosti a dokonce specifitě mezi použitými kvasinkovými testy. Rozdíly může způsobit jak jiný použitý organismus (kvasinky, lidské buněčné linie, zvířecí linie, různé tkáně atd.), tak i samotná metodika biotestu. Ještě větší neshodu v měřených hodnotách může přinést porovnání *in vitro* testů s *in vivo* pokusem, jak už bylo doloženo například ve studii od autorů Folmar et al. (2002).

Tato diplomová práce je první vědeckou prací popisující antiestrogenní působení látky BTBPE a to hned ve dvou *in vitro* testech. Nepodařilo se však prokázat koncentrační závislost tohoto působení z důvodu nízké citlivosti použitých testů a nízké rozpustnosti této látky. Rovněž látka PBBA vykazovala jisté antihormonální působení. Z důvodu rozpustnosti nebylo možné ověřit aktivitu této látky a hlavně její koncentrační závislost. O této látce také neexistují žádné vědecké práce popisující její endokrinní aktivity.

5.2. Biodegradační pokus

Z výsledků degradačního pokusu vyplývá, že jen tři zkoumané látky byly degradovány ligninolytickými houbami. Látka TBP byla dobře odbourávána všemi houbami už po 7 dnech s účinností až 97,5% pro houbu *Irpex lacteus*. Tato účinnost je srovnatelná se studií autorů Donoso et al. (2008), která uvádí účinnost 98,5% po 4 dnech trvání pokusu. V této práci byla použita houba *Trametes versicolor*, která v našem experimentu vykazovala účinnost 93,25% po sedmi dnech. I přes to jsou tyto výsledky srovnatelné a vypovídají o rychlé a účinné degradaci TBP ligninolytickými houbami. I jinými mikroorganismy (například bakteriemi) se podařilo

tuto látku rozložit, a tak se můžeme domnívat, že TBP není persistentní v životním prostředí jako dříve používané zpomalovače hoření.

Látka ATBB byla druhá z látek, která vykázala degradovatelnost v našem pokusu. Pro tuto látku existují doposud pouze předpoklady na základě fyzikálních a chemických parametrů, že tato látka může být polutantem v arktických oblastech (Brown a Wania, 2008). Autoři ve zmíněném článku však nepředpokládají, že by ATBB byla persistentní. K této domněnce dospěli při výpočtu modelu poločasu rozkladu vlivem OH radikálu. Tato práce je prvním popisem bioodbouratelnosti této látky pomocí ligninolytických hub s velice pozitivním výsledkem. Bylo už zjištěno, že se tato látka nachází v kalech čističek odpadních vod a že se v tomto prostředí špatně odpouívá, a tak může být degradace pomocí hub vhodným prostředkem na případné biotechnologické odbourávání.

Třetí látkou, kterou se podařilo z velké části odbourat, je PBBA. O této látce doposud nejsou známy žádné informace o biodegradovatelnosti, a tak tato práce je prvním přiblížením k této problematice. Naše výsledky, které vykazují až 92,2% úbytek této látky během sedmi dnů pokusu, jsou velmi slibné. Je však třeba dalšího vědeckého výzkumu i s ostatními mikroorganismy, aby se dokázala plně zodpovědět otázka možné persistence PBBA v životním prostředí.

U ostatních zkoumaných látek nebyl zaznamenán žádný úbytek během degradačního pokusu, nebo jen velmi malý. Toto zjištění může z části vysvětlovat hojnou přítomnost těchto látek v životním prostředí. Také to může naznačit případnou persistenci. Jestli se totiž zmíněné látky nerozkládají pomocí ligninolytických hub a jejich enzymů, které jsou mimochodem velmi účinné, tak je jen málo mikroorganismů, které by dokázaly odbourat tyto látky. Toto je závažné hlavně pro látky BTBPE a PBPH, u kterých je tato práce zřejmě první studií mikrobiální degradace, a které nebyly nijak rozkládány během experimentu.

Ostatní látky jako PBEB, PBT, HBB a DBB také nevykázaly výraznější úbytek během pokusu. O těchto látkách neexistují téměř žádné studie popisující mikrobiální degradaci, a tak je tato práce prvním přiblížením do této problematiky. Tyto látky byly nelézány i v arktických oblastech, což by mohlo být způsobeno právě velmi špatným rozkladem v životním prostředí a dálkovým transportem atmosférou. O těchto látkách sice neexistuje tolik publikací popisujících přítomnost v životním prostředí jako o předchozích BTBPE a PBPH, i tak je však třeba dalších prací zjišťujících jejich odbouratelnost. Tyto látky mohou být stejně persistentní v životním prostředí jako známější hexachlorbenzen nebo polychlorované bifenyly.

5.3. Optimalizace analytické metody

Pro derivatizaci látky TBP byla optimalizována metoda pomocí BSTFA + TMCS. V literatuře se uvádějí různé postupy derivatizace. Například Thomsen et al. (2001), Suzuki et al. (2008) i Wilkins et al. (1997) používají derivatizaci diazomethanem, Mardones et al. (2008) používá derivatizaci anhydridem kyseliny octové, Takigami et al. (2009) používá ethylaci, ale už neuvádí jakým činidlem. Zmíněné články vůbec neuvádějí výtěžnost použité derivatizace. V této diplomové práci bylo zjištěno, že optimalizovaná metoda pomocí BSTFA + TMCS, 99:1 má 90% výtěžnost derivatizace, což je dostatečné pro analýzu. Rozněž bylo zjištěno, že metodou pomocí diazomethanu vznikají i další produkty této derivatizace a že nedosahuje takové výtěžnosti jako pomocí BSTFA.

Pro většinu zkoumaných látek byla optimalizována metoda analýzy na plynové chromatografii s hmotnostním detektorem. Tato metoda je velice citlivá s mezí kvantifikace 1 ng/ml pro některé látky, a tak by se případně dala aplikovat na environmentální vzorky. Je však třeba dalšího vývoje metod extrakce a purifikace z komplexních environmentálních matric, aby bylo možné tyto látky stanovovat v různých složkách životního prostředí.

Pro látku TBPA, u které se nepodařilo dosáhnout důvěryhodných výsledků, je třeba objasnit, jak s touto látkou pracovat. Je možné, že tato látka v zásobním roztoku reaguje sama se sebou nebo se vzdušnou vlhkostí. Látka TBBPA-DBPE je natolik odlišná (pravděpodobně svojí nízkou těkavostí a vysokou molekulovou hmotností) od ostatních zkoumaných látek, že ji není možné analyzovat společně s ostatními. Bylo by třeba použití jiných analytických postupů na separaci a detekci této látky.

6. Závěr

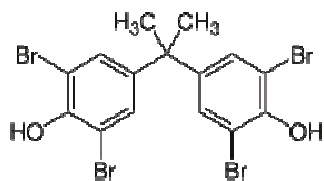
Tato práce přináší důkaz o antihormonálním působení látky TBP. Tato látka by mohla být novým endokrinním disruptorem, nicméně ještě je třeba ověřit její působení v testech *in vivo*. Připomeňme, že tato látka je široce využívána a její výroba pouze v USA činila 23000 tun v roce 2006. Závažné je pak také to, že tento zpomalovač hoření byl stanovován v krevní plasmě a dokonce v pupeční šňůře rodiček. Tato zjištění by měla dát podnět k dalším vědeckým pracem a případně k legislativnímu zákazu této látky. Rovněž tato práce přináší první výsledky o možném antiestrogenním působení látky BTBPE. U této látky je třeba ověřit její účinky u více citlivých testů, které by dokázaly doložit koncentrační závislost tohoto efektu. Ostatní bromované zpomalovače hoření nevykázaly žádné výraznější hormonální působení. Je však nadále třeba obezřetnosti v používání těchto látek.

Tato práce také přináší informace o degradaci vybraných BFR pomocí ligninolytických hub. U většiny látek je to vůbec první práce, která se tímto zabývá. U látek TBP, ATBB a PBBA je odbouratelnost pomocí hub poměrně snadná a rychlá, zatímco ostatní látky se odbourávaly jen velmi málo nebo vůbec. To přináší mnoho otázek ohledně degradovatelnosti těchto látek v životním prostředí a celkově jejich persistenci.

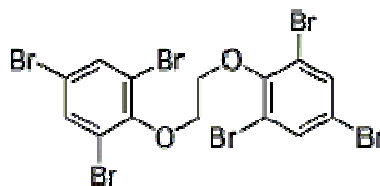
Zkoumané látky lze stanovovat s využitím plynové chromatografie s hmotnostním detektorem, a to metodou popisovanou v této práci. Bylo zjištěno, že pro látku TBP je třeba použít metodu derivatizace pomocí BSTFA a nikoliv pomocí diazomethanu, jak uvádí většina vědeckých článků.

Přílohy:

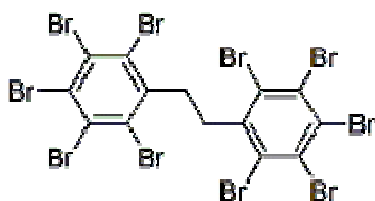
Strukturní vzorce vybraných bromovaných zpomalovačů hoření



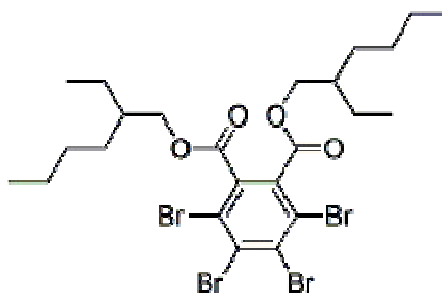
Tetrabrombisfenol A



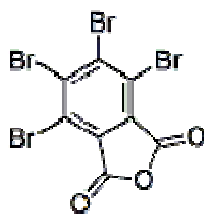
1,2-bis(2,4,6-tribromphenoxy) ethane



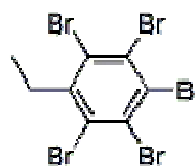
dekabromdifenyl ethan



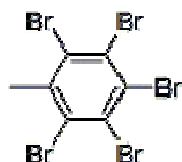
bis(2-ethylhexyl) tetrabromftalát



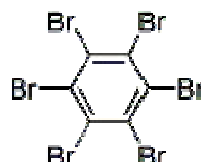
Anhydrid kyseliny tetrabromftalové



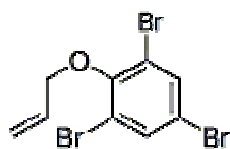
2,3,4,5,6-pentabromomethylbenzen



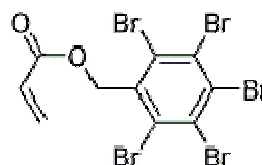
2,3,4,5,6-pentabromtoluen



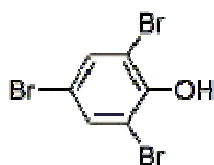
hexabrombenzen



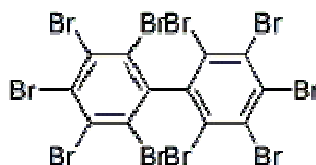
2-allyloxy-1,3,5-tribrombenzen



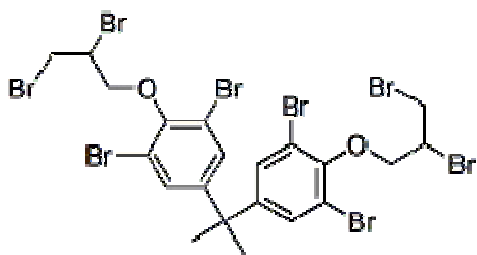
pentabrombenzyl akrylát



2,4,6-tribromfenol



dekabrombifeny



Tetrabrombisfenol A (dibrompropyl ether)

Tabulka 1

Vývoj spotřeby zpomalovačů hoření v Japonsku			
látky	množství (tuny)		
	1986	1990	1994
Bromované			
Tetrabrombisfenol A (TBBPA)	12000	23000	24000
Dekabrombifenyl ether	3000	10000	5500
Oktabrombifenyl ether	600	1100	500
Tetrabrombifenyl ether	1000	1000	0
Hexabromcyklododekan	600	700	1600
Bis(tetrabromftalimido) ethane	-	1000	2500
Tribromfenol	100	450	3500
Bis(tribromfenoxy) ethane	400	400	900
TBBPA polykarbonát oligomer	-	-	2500
Bromovaný polystyrén	-	-	1300
TBBPA epoxy oligomer	-	3000	7000
ostatní	2400	-	2150
mezisoučet	20000	40650	51450
Chlorované			
Chlorované parafíny	4000	4500	4300
ostatní	850	700	900
mezisoučet	4850	5200	5200
Fosforečnanové			
Halogenované estery	3000	3000	3100
Nehalogenované estery	4000	4400	4400
ostatní	1750	1750	3310
mezisoučet	8750	9150	10810

Anorganické			
Oxid antimonitý	8300	16000	17000
Hydratovaný hliník	48000	37000	42000
ostatní	7200	8400	9000
mezisoučet	63500	61400	68000
celkem	97100	116400	135460

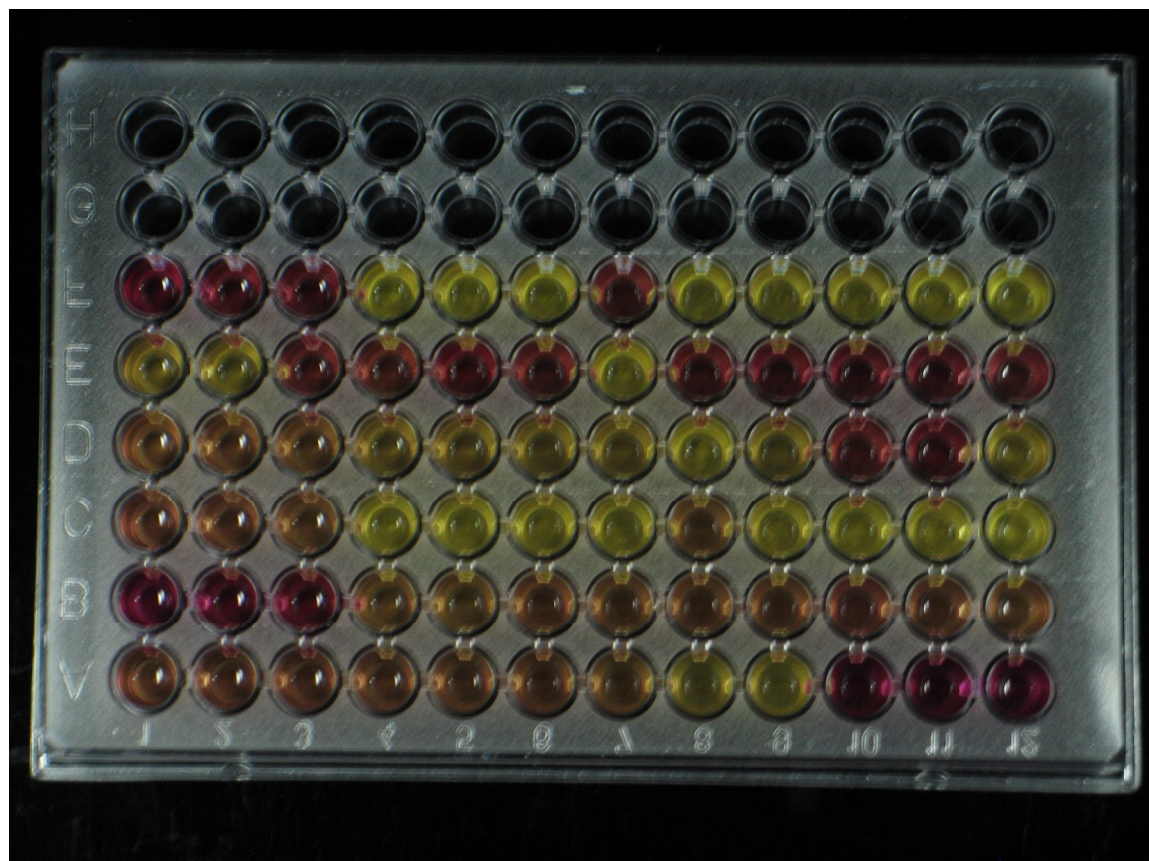
Tabulka 2

Spotřeba vybraných bromovaných zpomalovačů hoření v různých oblastech světa v roce 2001 (tuny)						
	Amerika	Evropa	Asie	zbytek světa	celkem	% z celkové světové spotřeby
tetrabrombisfenol A	18000	11600	89400	600	119700	59
hexabromcyklododekan	2800	9500	3900	500	16700	8
deka-BDE	24500	7600	23000	1050	56100	27
okta-BDE	1500	610	1500	180	3790	2
penta-BDE	7100	150	150	100	7500	4
celkem	53900	29460	117950	2430	203790	100

Law et al., 2006b

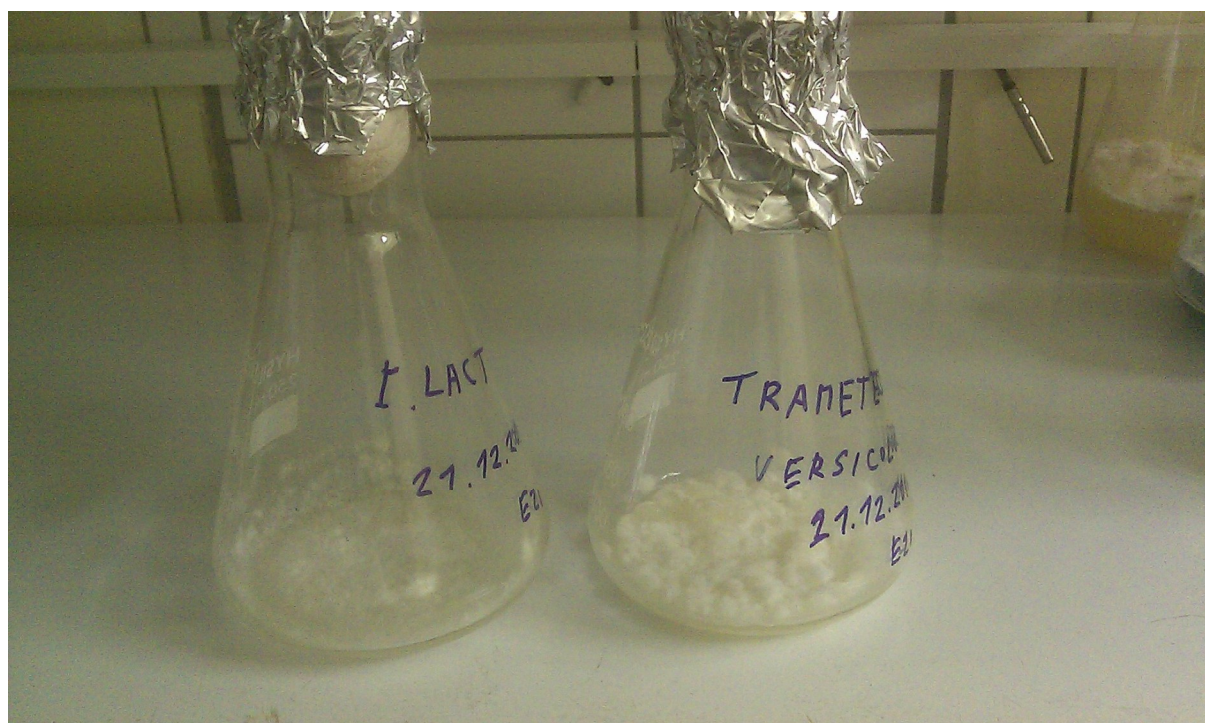
Obrázek 1

Ukázka β -galaktázového testu na estrogení aktivity



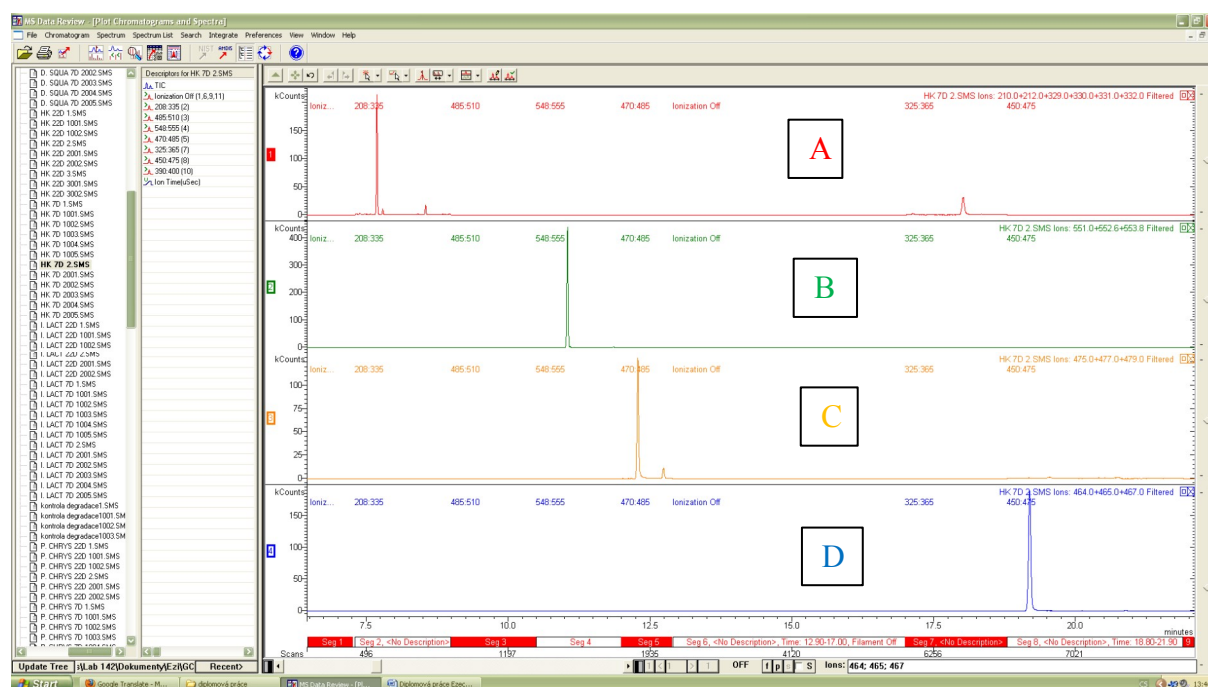
Obrázek 2

Ukázka houbové kultury z deградаčního pokusu



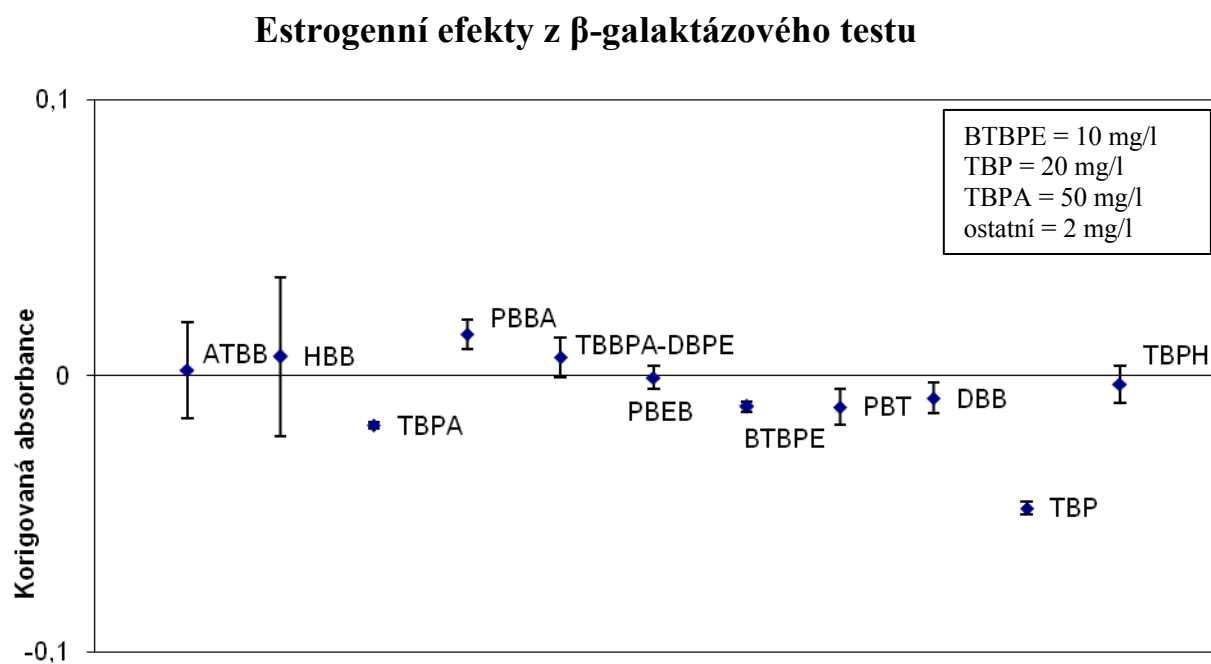
Obrázek 3

Ukázka chromatogramů z deградаčního pokusu



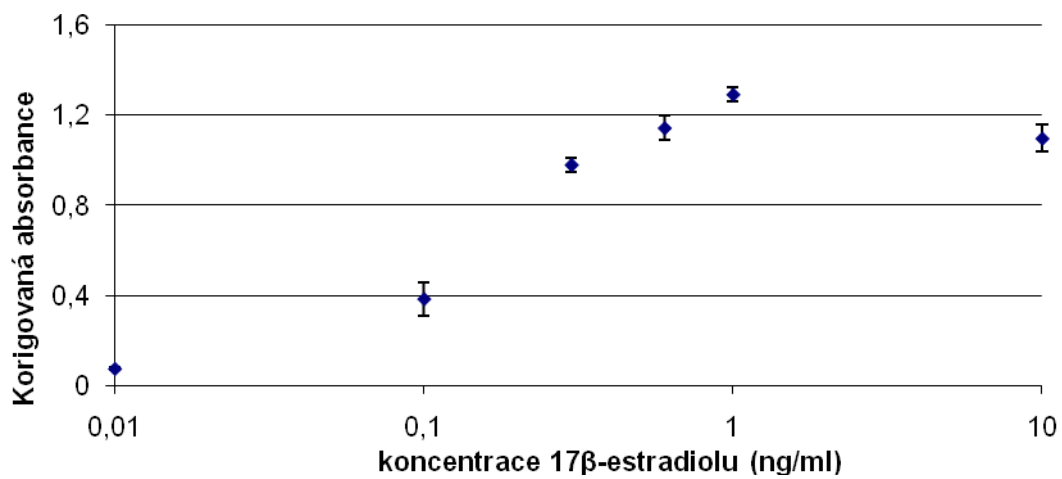
Dominantní pík v chromatogramu A představuje ATBB, v chromatogramu B HBB, v chromatogramu C PBBA a v chromatogramu D TBPH.

Graf 1



Graf 2

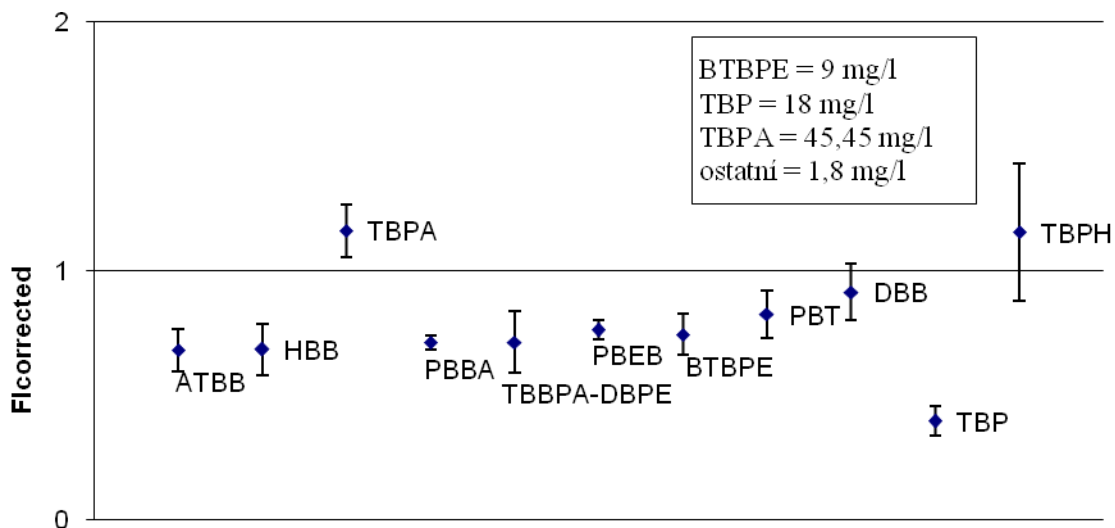
**Koncentrační závislost korigované absorbance na koncentraci
17 β -estradiolu**



Graf 3

Estrogenní efekty jednotlivých látek měřené bioluminescentním testem

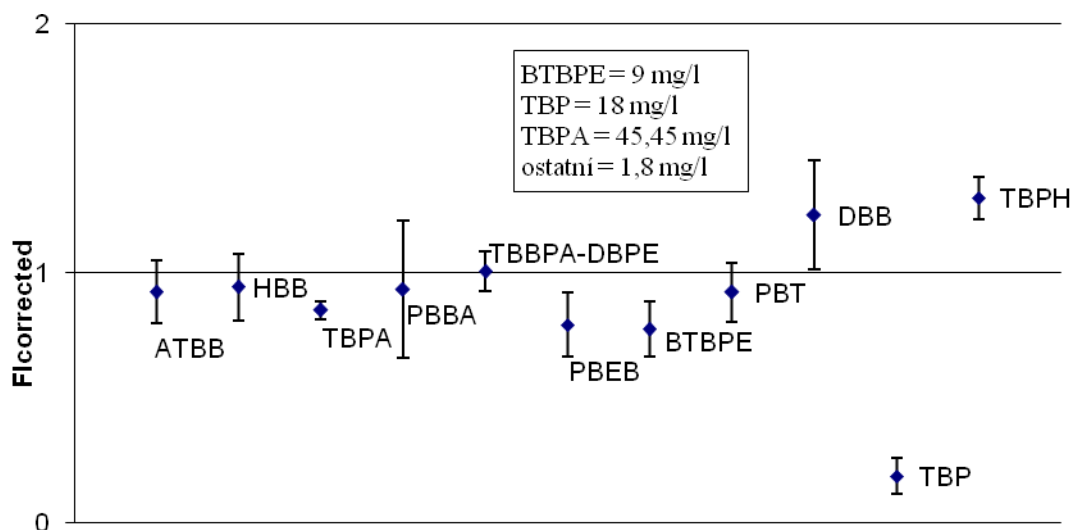
1 = slepý stanovení



Graf 4

Androgenní efekty jednotlivých látek měřené bioluminescentním testem

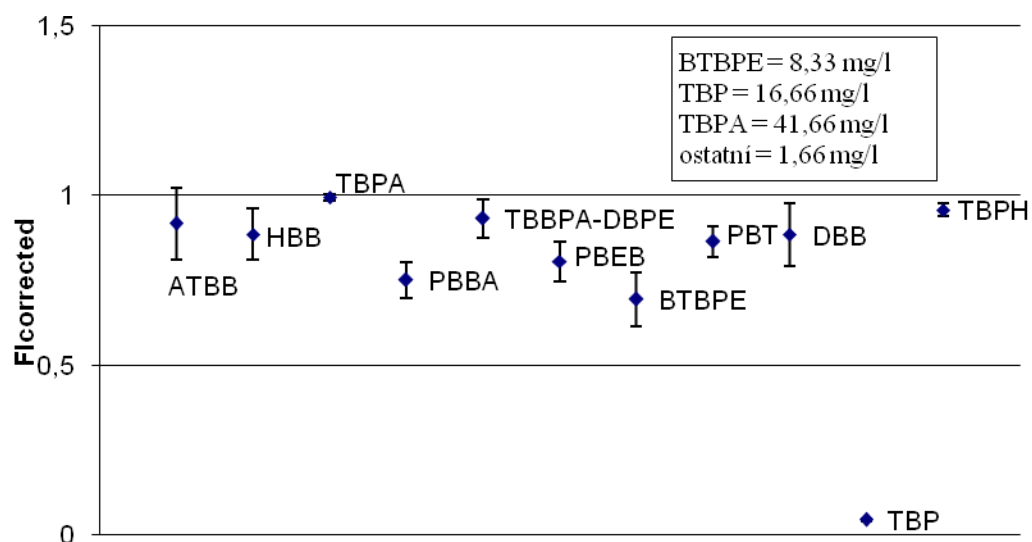
1 = slepý stanovení



Graf 5

Antiestrogenní efekty u jednotlivých látek měřené bioluminescentním testem

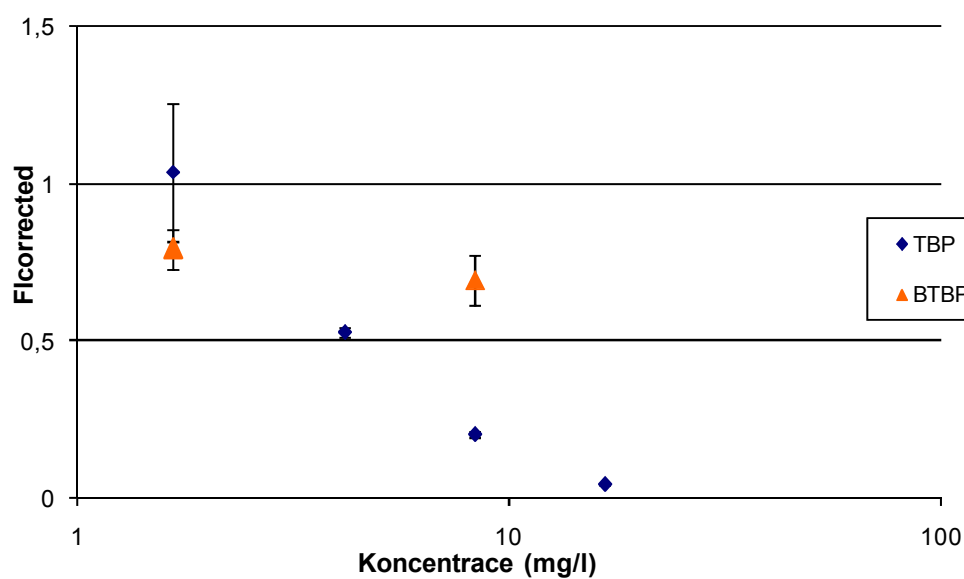
1 = odpověď čistého 17 β -estradiolu



Graf 6

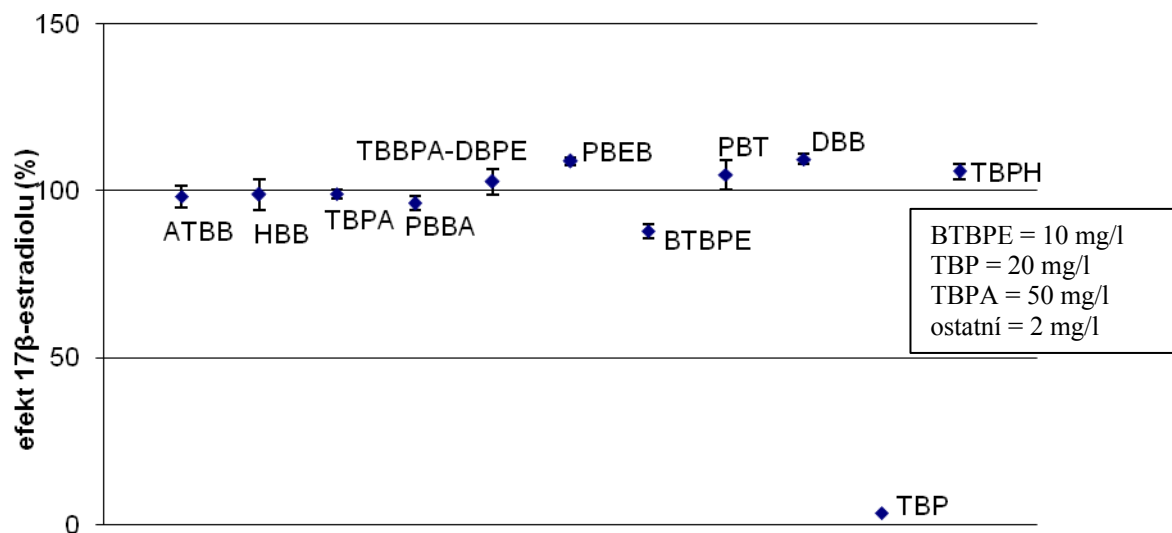
Antiestrogenní efekt vybraných látek z bioluminescentního pokusu

1 = odpověď čistého 17 β -estradiolu



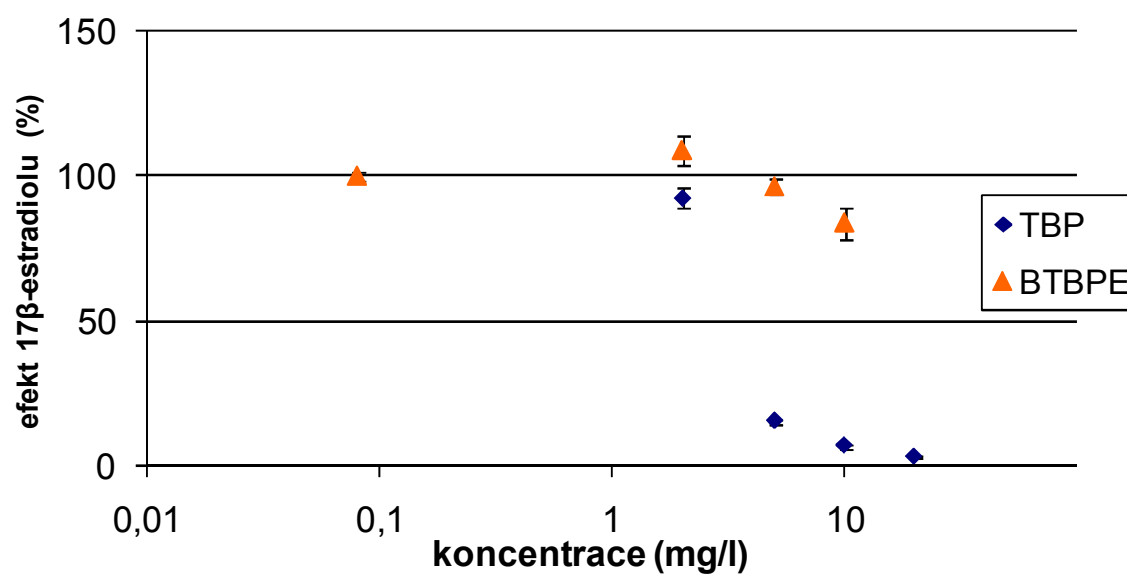
Graf 7

Antiestrogenní efekty všech látek měřené β -galaktázovým testem



Graf 8

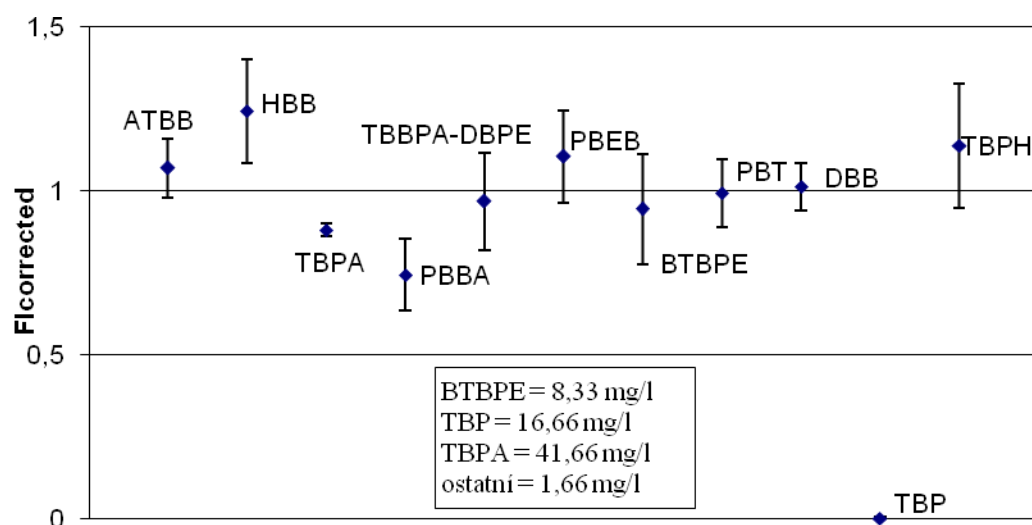
Antiestrogenní efekt vybraných látek měřené β -galaktázovým testem



Graf 9

Antiandrogenní efekty jednotlivých látek měřené bioluminescentním testem

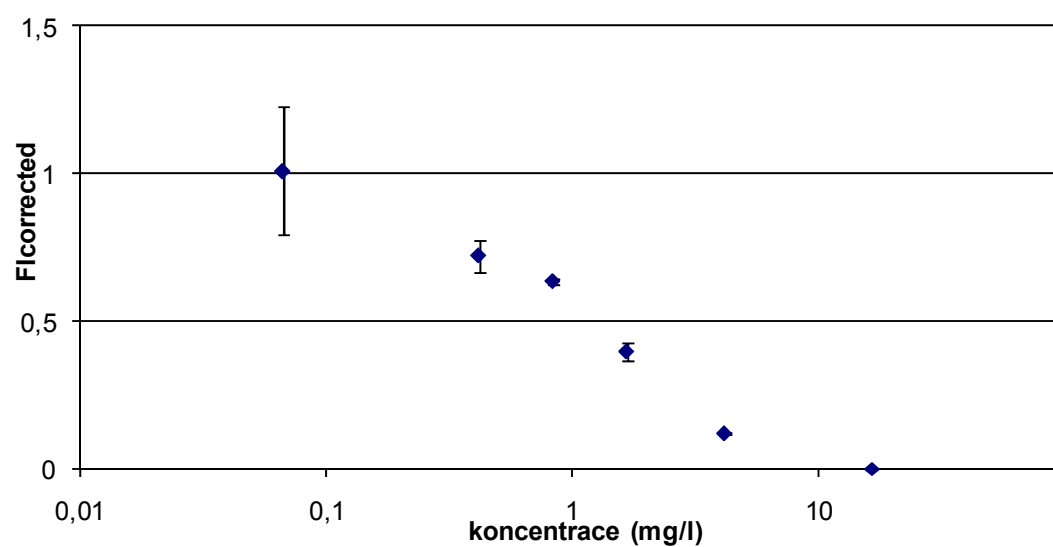
1 = odpověď čistého testosteronu



Graf 10

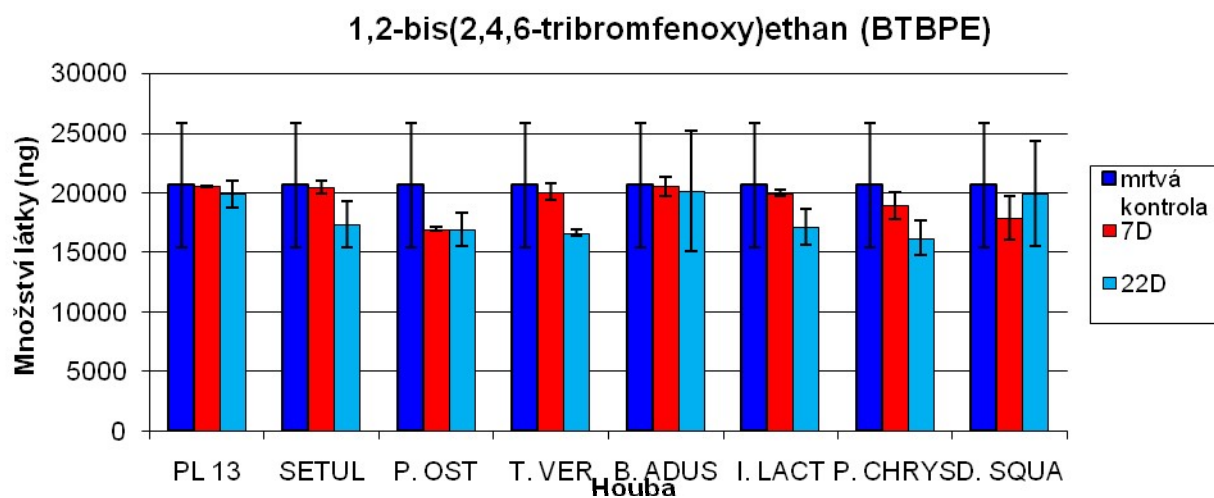
Antiandrogenní efekt TBP měřené bioluminescentním testem

1 = odpověď čistého testosteronu



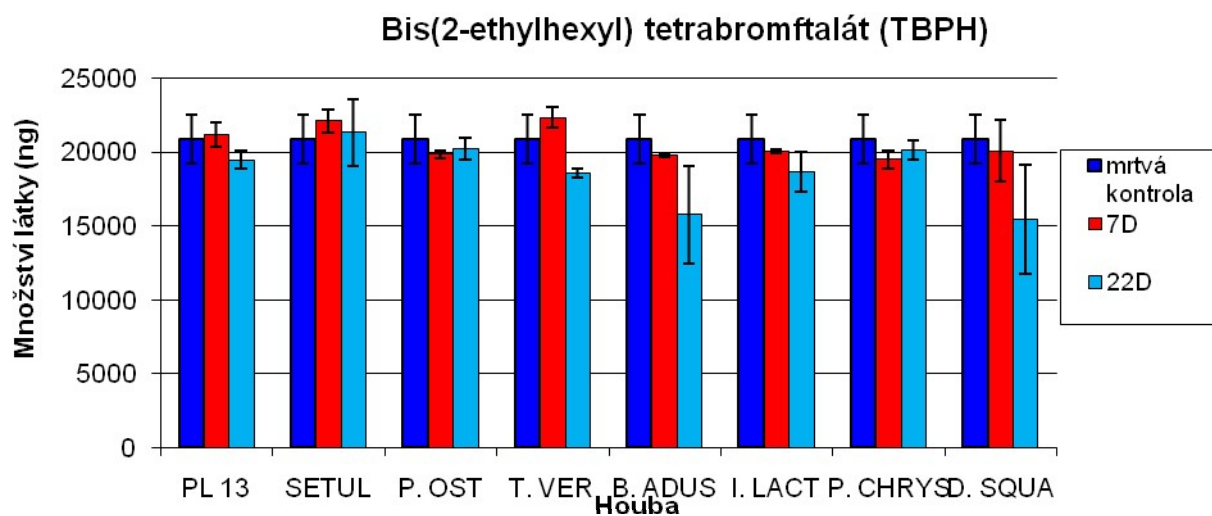
Graf 11

Výsledky degračního pokusu



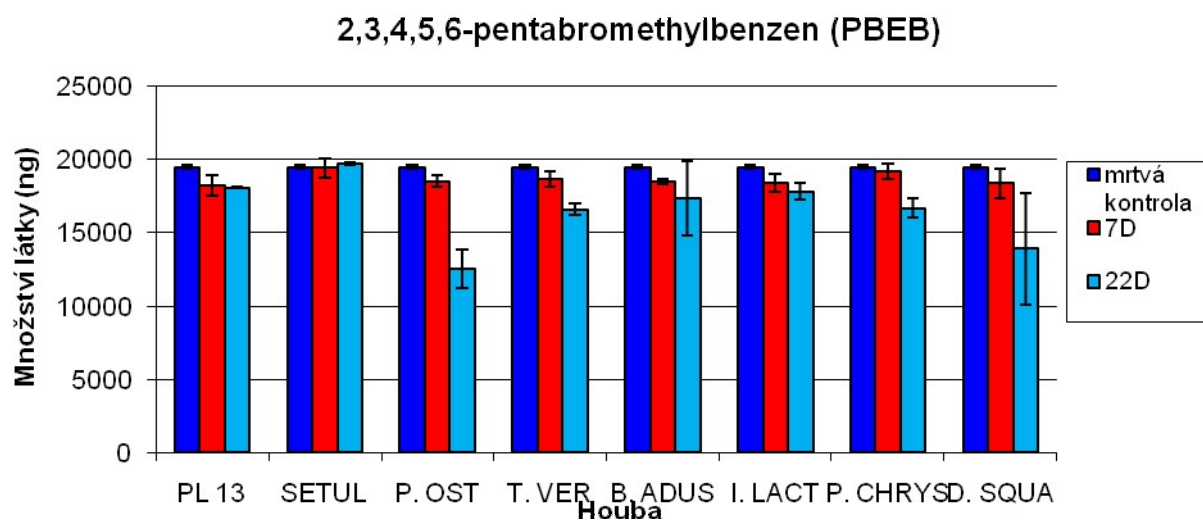
Graf 12

Výsledky degračního pokusu



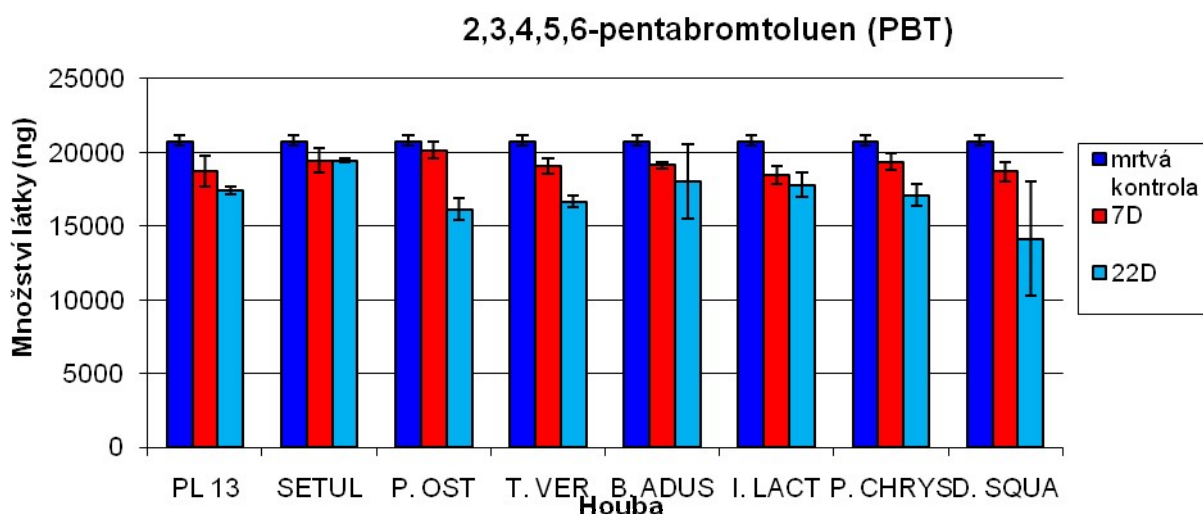
Graf 13

Výsledky degračního pokusu



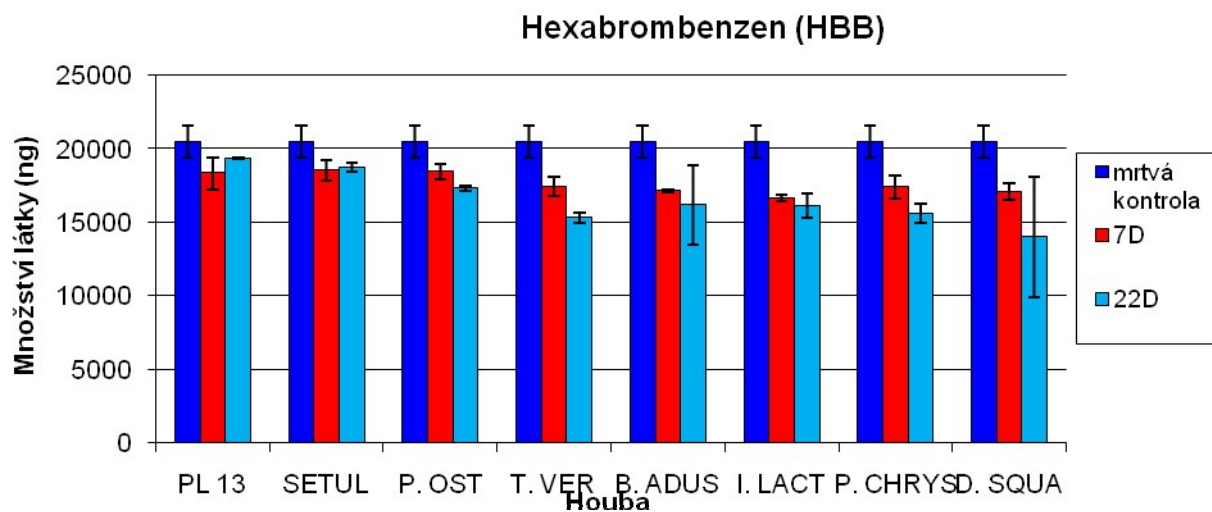
Graf 14

Výsledky degračního pokusu



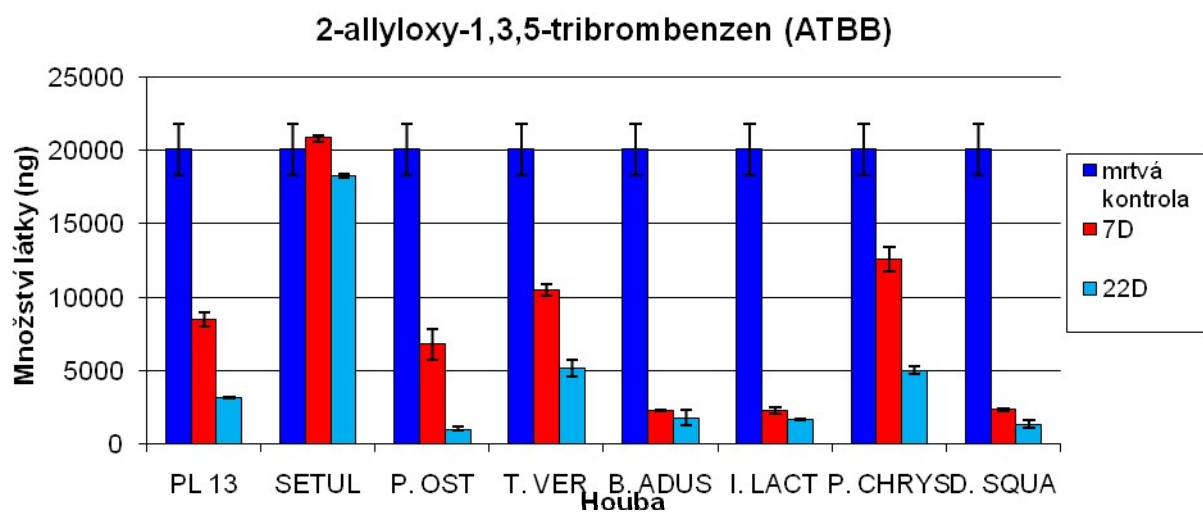
Graf 15

Výsledky degračního pokusu



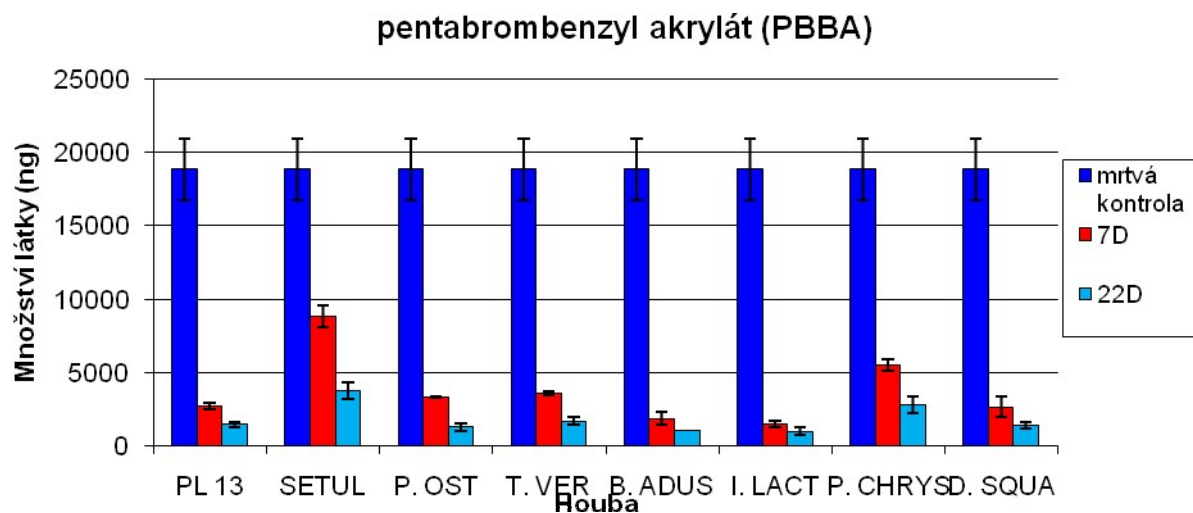
Graf 16

Výsledky degračního pokusu



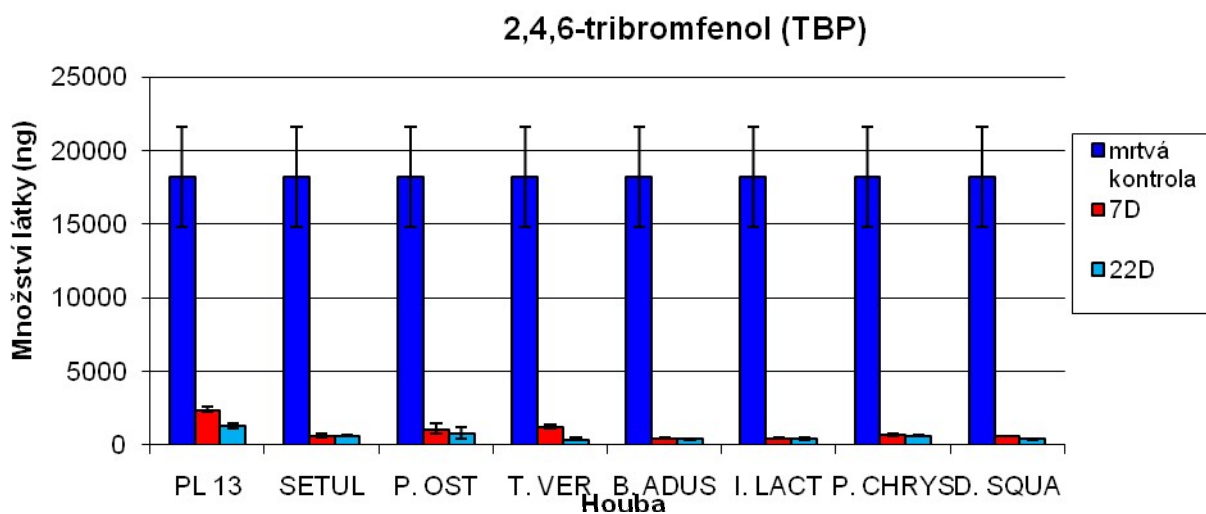
Graf 17

Výsledky degračního pokusu



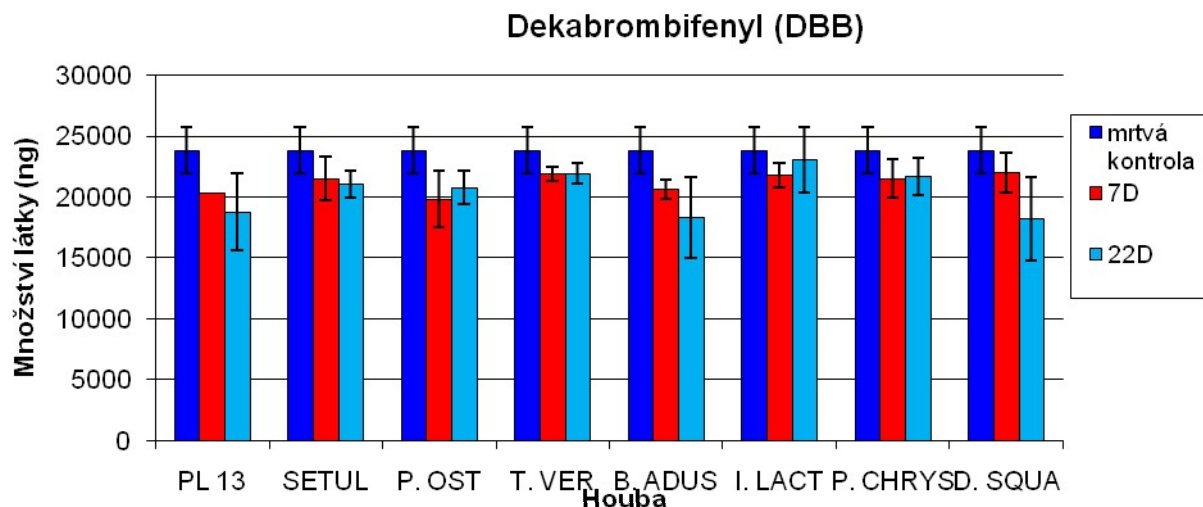
Graf 18

Výsledky degračního pokusu



Graf 19

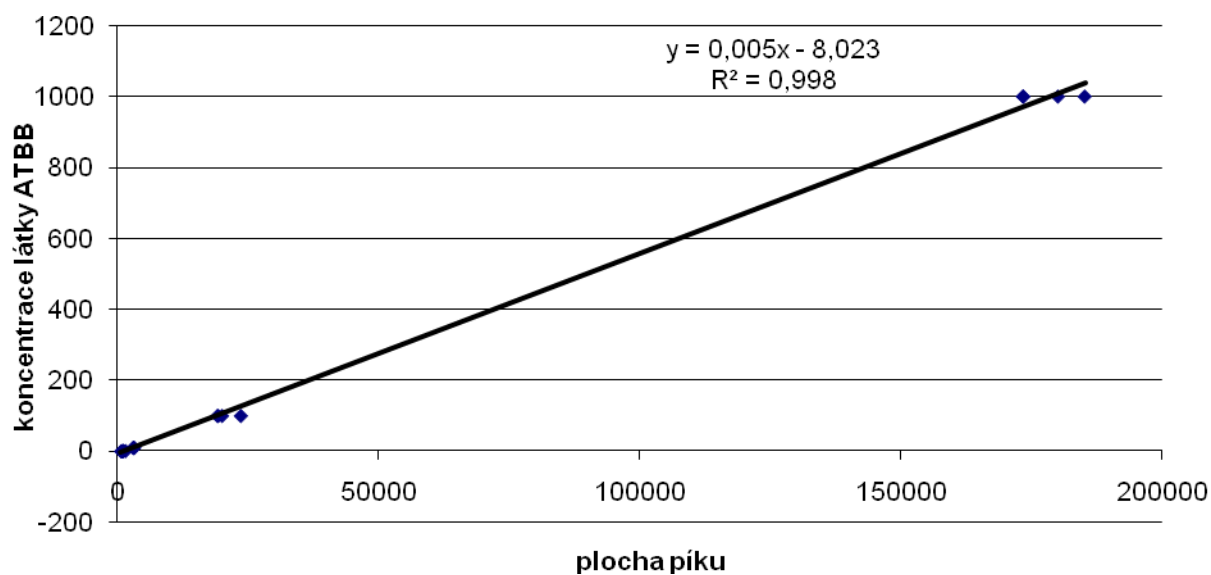
Výsledky degračního pokusu



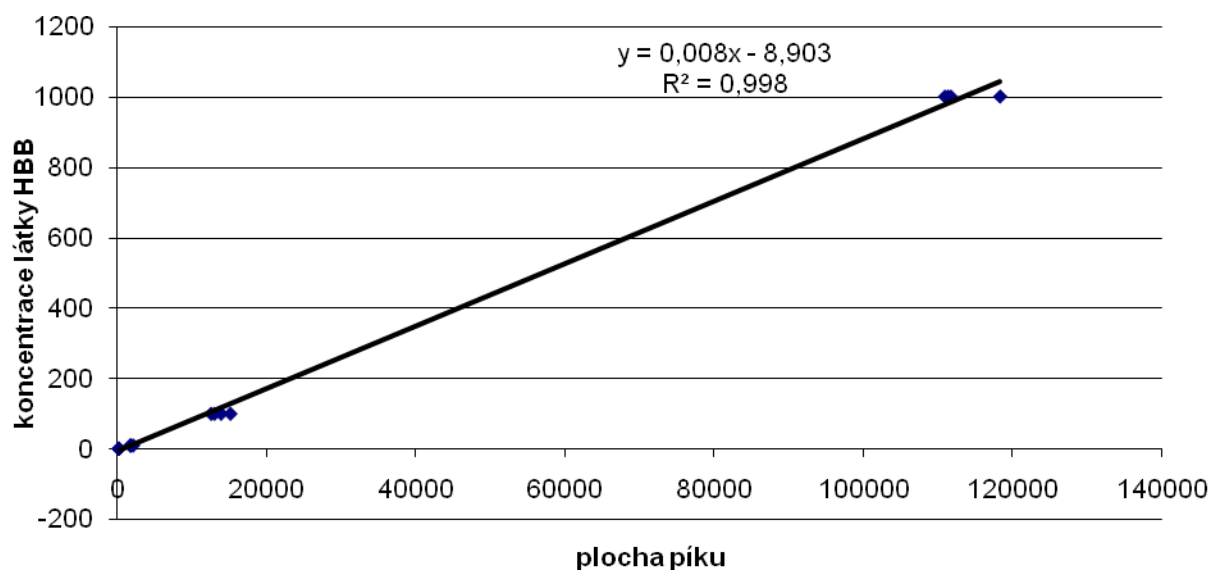
Příprava diazomethanu

Do erlenmayerovy baňky bylo nalito 100 ml chladného diethyletheru, ke kterému bylo přidáno 35 ml chladného 40% KOH. Do baňky bylo dáno magnetické míchadélko a nechalo se točit při nízkých otáčkách. Vše bylo děláno v ledové lázni, aby teplota nepřekročila 5 °C. Do baňky byla po malých dávkách přidávána nitrosomethyl močovina na celkovou koncentraci 0,1 M. Po rozpuštění byl éterický roztok převeden do chladné baňky se šroubovým uzávěrem obsahující KOH. Po půl hodině byl tento roztok znova převeden do nové baňky se šroubovým uzávěrem obsahující KOH. Poté byl roztok diazomethanu skladován v mrazáku při teplotě -20 °C.

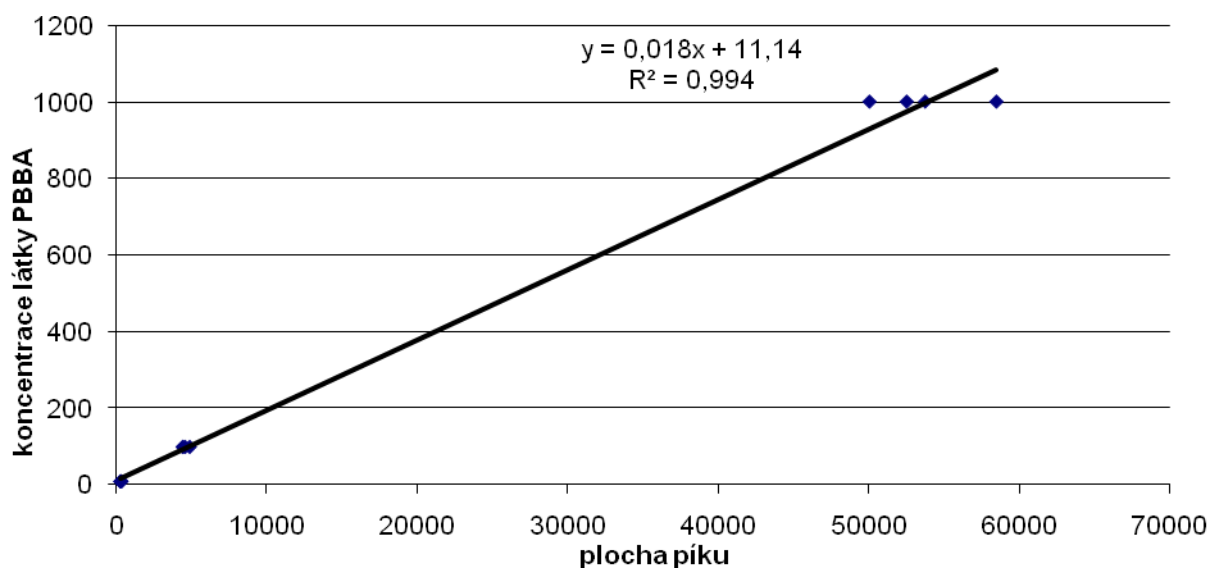
Kalibrační přímka pro látku ATBB



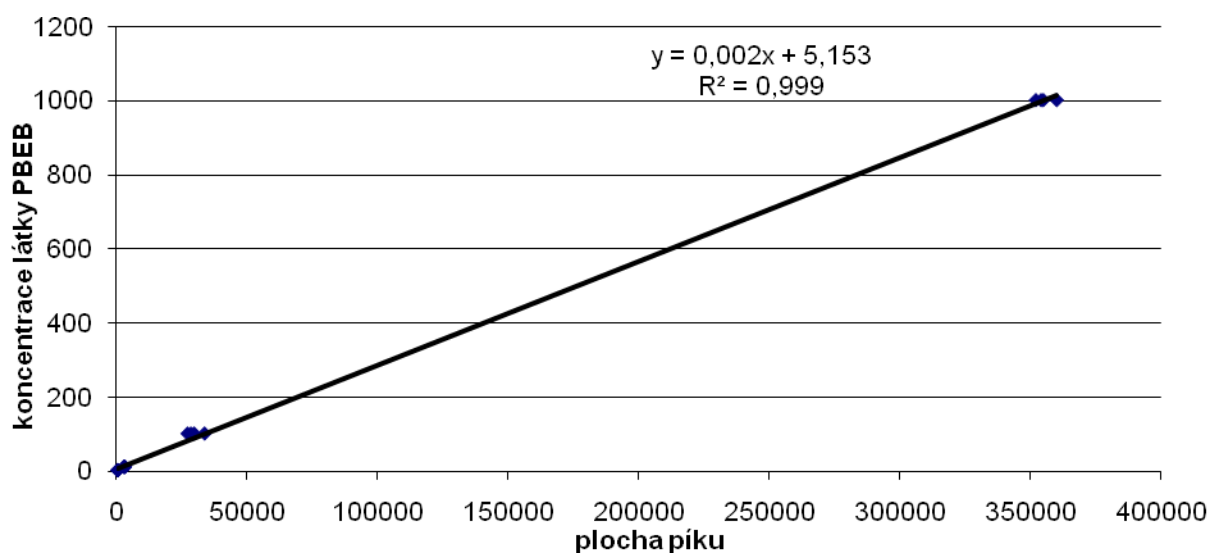
Kalibrační přímka pro látku HBB



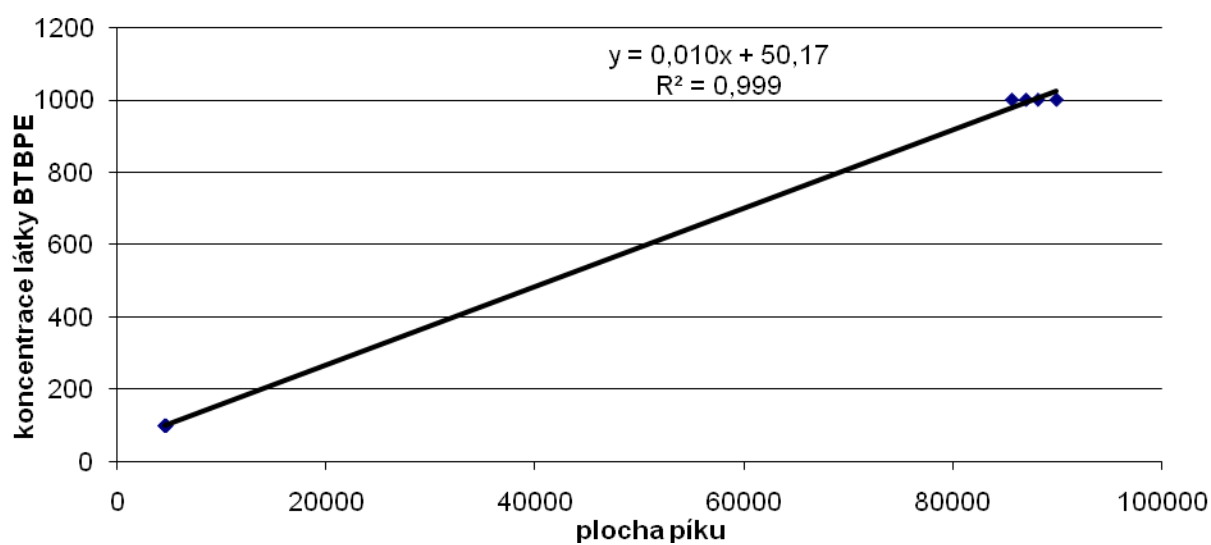
Kalibrační přímka pro látku PBBA



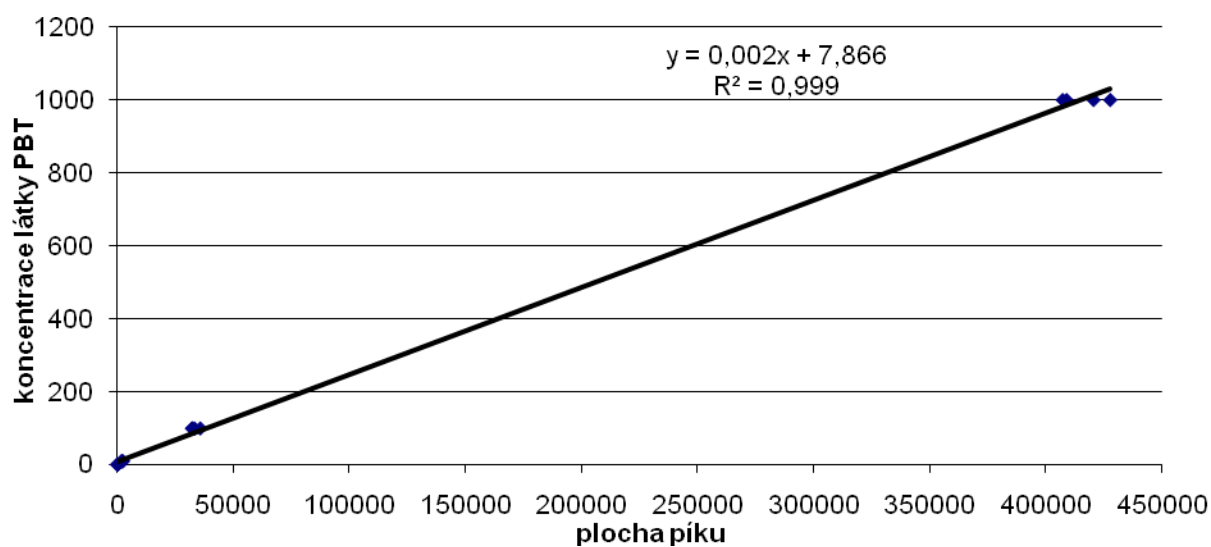
Kalibrační přímka pro látku PBEB



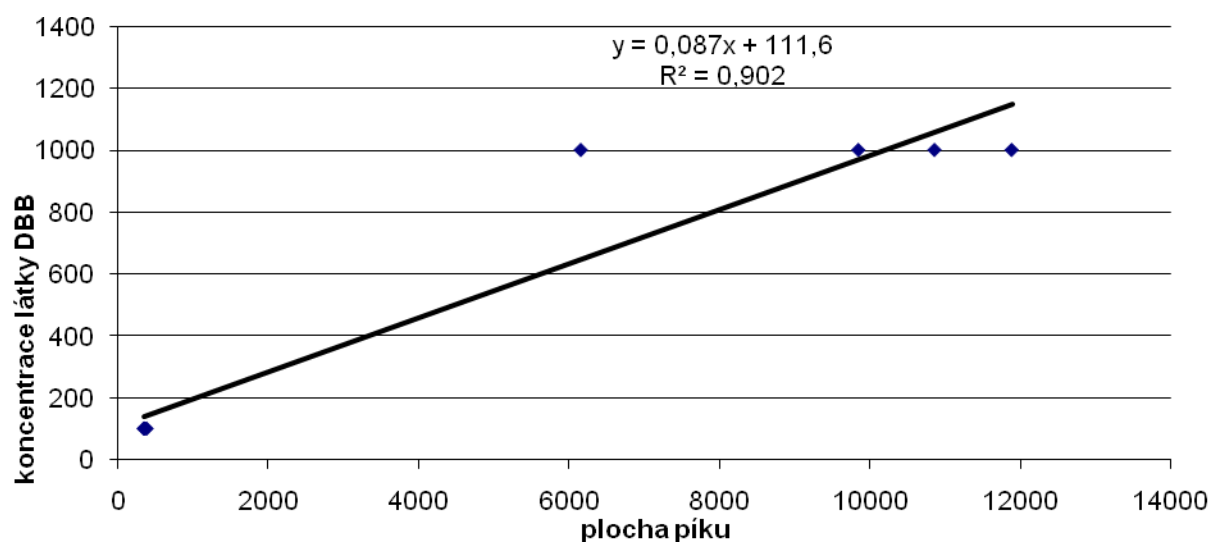
Kalibrační přímka pro látku BTBPE



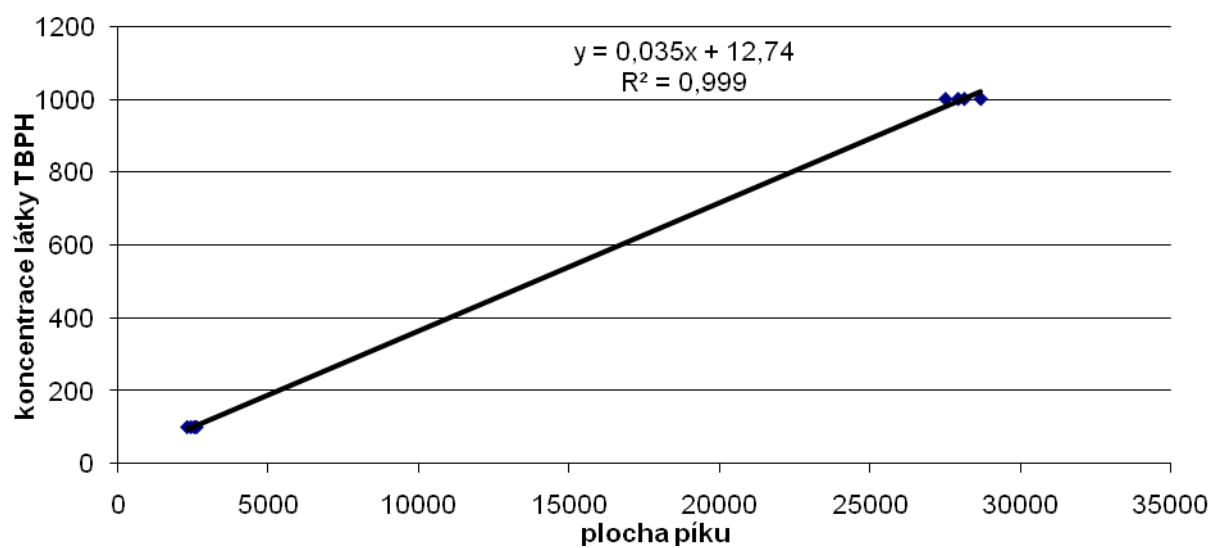
Kalibrační přímka pro látku PBT



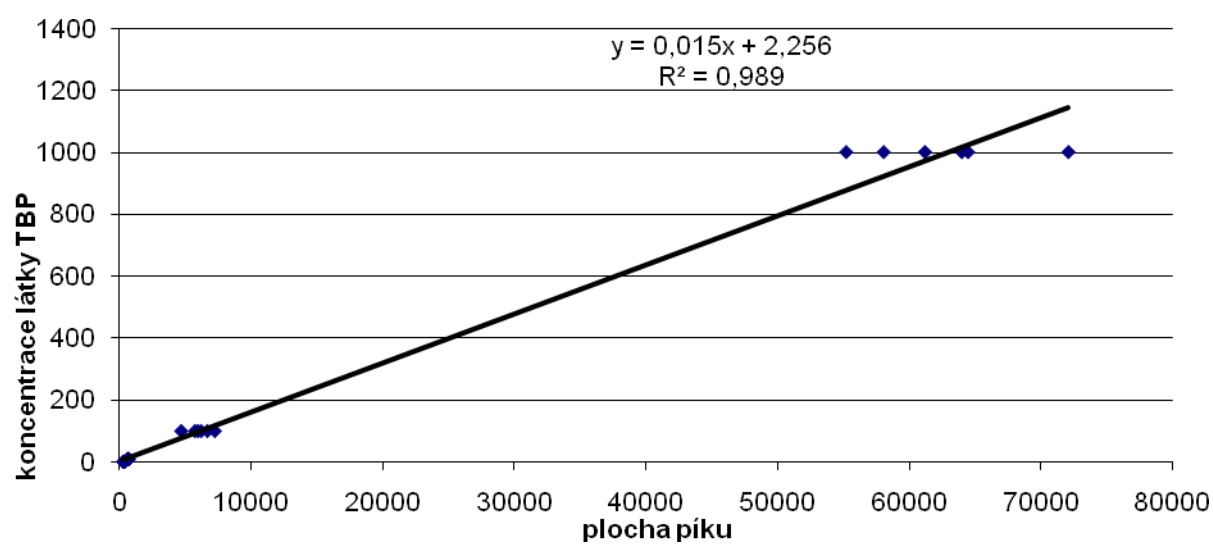
Kalibrační přímka pro DBB



Kalibrační přímka pro TBPH



Klibrační přímka pro látku TBP



Použitá literatura

- Aguayo, J., Barra, R., Becerra, J., Martinez, M., 2009. Degradation of 2,4,6-tribromophenol and 2,4,6-trichlorophenol by aerobic heterotrophic bacteria present in psychrophilic lakes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 25, 553-560.
- Alaee, M., Arias, P., Sjodin, A., Bergman, A., 2003. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment International* 29, 683-689.
- Ali, N., Harrad, S., Goosey, E., Neels, H., Covaci, A., 2011. "Novel" brominated flame retardants in Belgian and UK indoor dust: Implications for human exposure. *Chemosphere* 83, 1360-1365.
- Alonso, M., Casado, S., Miranda, C., Tarazona, J.V., Navas, J.M., Herradon, B., 2008. Decabromobiphenyl (PBB-209) activates the aryl hydrocarbon receptor while decachlorobiphenyl (PCB-209) is inactive: Experimental evidence and computational rationalization of the different behavior of some halogenated biphenyls. *Chemical Research in Toxicology* 21, 643-658.
- Belfroid, A., Vandenberg, M., Seinen, W., Hermens, J., Vangestel, K., 1995. UPTAKE, BIOAVAILABILITY AND ELIMINATION OF HYDROPHOBIC COMPOUNDS IN EARTHWORMS (EISENIA-ANDREI) IN FIELD-CONTAMINATED SOIL. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 605-612.
- Bhatt, M., Cajthaml, T., Sasek, V., 2002. Mycoremediation of PAH-contaminated soil. *Folia Microbiologica* 47, 255-258.
- Birnbaum, L.S., Staskal, D.F., 2004. Brominated flame retardants: Cause for concern? *Environmental Health Perspectives* 112, 9-17.
- Breitholtz, M., Nyholm, J.R., Karlsson, J., Andersson, P.L., 2008. Are individual NOEC levels safe for mixtures? A study on mixture toxicity of brominated flame-retardants in the copepod *Nitocra spinipes*. *Chemosphere* 72, 1242-1249.
- Brenner, A., Mukmenev, I., Abeliovich, A., Kushmaro, A., 2006. Biodegradability of tetrabromobisphenol A and tribromophenol by activated sludge. *Ecotoxicology* 15, 399-402.
- Brouwers, M.M., van Tongeren, M., Hirst, A.A., Bretveld, R.W., Roeleveld, N., 2009. Occupational exposure to potential endocrine disruptors: further development of a job exposure matrix. *Occupational and Environmental Medicine* 66, 607-614.
- Brown, D.J., Van Overmeire, I., Goeyens, L., Denison, M.S., De Vito, M.J., Clark, G.C., 2004. Analysis of Ah receptor pathway activation by brominated flame retardants. *Chemosphere* 55, 1509-1518.
- Brown, T.N., Wania, F., 2008. Screening chemicals for the potential to be persistent organic pollutants: A case study of Arctic contaminants. *Environmental Science & Technology* 42, 5202-5209.

- Cajthaml, T., Erbanova, P., Kollmann, A., Novotny, C., Sasek, V., Mougin, C., 2008. Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiologica* 53, 289-294.
- Cajthaml, T., Kresinova, Z., Svobodova, K., Moder, M., 2009. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75, 745-750.
- Canton, R.F., Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Bergman, A., van den Berg, M., 2005. Inhibition and induction of aromatase (CYP19) activity by brominated flame retardants in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicological Sciences* 88, 447-455.
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S., Labadie, M.D., 2004. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1255-1262.
- Christen, V., Crettaz, P., Oberli-Schrammli, A., Fent, K., 2010. Some flame retardants and the antimicrobials triclosan and triclocarban enhance the androgenic activity in vitro. *Chemosphere* 81, 1245-1252.
- Contreras, D., Oviedo, C., Valenzuela, R., Freer, J., Rojo, K., Rodriguez, J., 2009. TRIBROMOPHENOL DEGRADATION BY A CATECHOL-DRIVEN FENTON REACTION. *Journal of the Chilean Chemical Society* 54, 141-143.
- Covaci, A., Harrad, S., Abdallah, M.A.E., Ali, N., Law, R.J., Herzke, D., de Wit, C.A., 2011. Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment International* 37, 532-556.
- Davis, E.F., Stapleton, H.M., 2009. Photodegradation Pathways of Nonabrominated Diphenyl Ethers, 2-Ethylhexyltetrabromobenzoate and Di(2-ethylhexyl)tetrabromophthalate: Identifying Potential Markers of Photodegradation. *Environmental Science & Technology* 43, 5739-5746.
- Davis, J.W., Gonsior, S.J., Markham, D.A., Friederich, U., Hunziker, R.W., Ariano, J.M., 2006. Biodegradation and product identification of C-14 hexabromocyclododecane in wastewater sludge and freshwater aquatic sediment. *Environmental Science & Technology* 40, 5395-5401.
- de Wit, C.A., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46, 583-624.
- de Wit, C.A., Alaei, M., Muir, D.C.G., 2006. Levels and trends of brominated flame retardants in the Arctic. *Chemosphere* 64, 209-233.
- de Wit, C.A., Herzke, D., Vorkamp, K., 2010. Brominated flame retardants in the Arctic environment - trends and new candidates. *Science of the Total Environment* 408, 2885-2918.
- Donaldson, J.D., Donbavand, J., Hirschler, M.M., 1983. FLAME RETARDANCE AND SMOKE SUPPRESSION BY TIN(IV) OXIDE PHASES AND DECABROMOBIPHENYL. *European Polymer Journal* 19, 33-41.

Donoso, C., Becerra, J., Martinez, M., Garrido, N., Silva, M., 2008. Degradative ability of 2,4,6-tribromophenol by saprophytic fungi *Trametes versicolor* and *Agaricus augustus* isolated from Chilean forestry. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24, 961-968.

Dvir, H., Goldraich, M., Gottlieb, M., Daren, S., Cuesta, J.L., 2001. Distribution of a brominated acrylate flame retardant in polypropylene. *Polymer Degradation and Stability* 74, 465-474.

Dvir, H., Gottlieb, M., Daren, S., Tartakovsky, E., 2003. Optimization of a flame-retarded polypropylene composite. *Composites Science and Technology* 63, 1865-1875.

Eljarrat, E., de la Cal, A., Barcelo, D., 2004. Determination of decabromodiphenyl ether in sediments using selective pressurized liquid extraction followed by GC-NCI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 610-614.

Ezechiáš, M., 2009. Bromované zpomalovače hoření a jejich vliv na zdraví a ekosystémy. *Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Ústav pro životní prostředí*, 41 str.

Fisk, P.R., Girling, A.E., Wildey, R.J., 2003. PRIORITISATION OF FLAME RETARDANTS FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT. *Environment Agency*, 123 str.

Flodin, C., Whitfield, F.B., 1999. Biosynthesis of bromophenols in marine algae. *Water Science and Technology* 40, 53-58.

Folmar, L.C., Hemmer, M.J., Denslow, N.D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H., Grau, E.G., 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology* 60, 101-110.

Gauthier, L.T., Hebert, C.E., Weseloh, D.V.C., Letcher, R.J., 2007. Current-use flame retardants in the eggs of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great lakes. *Environmental Science & Technology* 41, 4561-4567.

George, K.W., Haggbloom, M.M., 2008. Microbial O-methylation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A. *Environmental Science & Technology* 42, 5555-5561.

Gerecke, A.C., Giger, W., Hartmann, P.C., Heeb, N.V., Kohler, H.P.E., Schmid, P., Zennegg, M., Kohler, M., 2006. Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere* 64, 311-317.

Gouteux, B., Alaee, M., Mabury, S.A., Pacepavicius, G., Muir, D.C.G., 2008. Polymeric Brominated Flame Retardants: Are They a Relevant Source of Emerging Brominated Aromatic Compounds in the Environment? *Environmental Science & Technology* 42, 9039-9044.

Guerra, P., Eljarrat, E., Barcelo, D., 2010. Analysis and occurrence of emerging brominated flame retardants in the Llobregat River basin. *Journal of Hydrology* 383, 39-43.

Hakk, H., Larsen, G., Bowers, J., 2004. Metabolism, tissue disposition, and excretion of 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane (BTBPE) in male Sprague-Dawley rats. *Chemosphere* 54, 1367-1374.

Hale, R.C., La Guardia, M.J., Harvey, E., Gaylor, M.O., Mainor, T.M., 2006. Brominated flame retardant concentrations and trends in abiotic media. *Chemosphere* 64, 181-186.

Hamers, T., Kamstra, J.H., Sonneveld, E., Murk, A.J., Kester, M.H.A., Andersson, P.L., Legler, J., Brouwer, A., 2006. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicological Sciences* 92, 157-173.

Haneke, K. E., 2002a, Tetrabromobisphenol A [79-94-7] Review of Toxicological Literature, National Institute of Environmental Health Sciences, Integrated Laboratory Systems, Inc., 33 str.

Haneke, K. E., 2002b, Tetrabromobisphenol A bis(2,3-dibromopropyl ether) [21850-44-2] Review of Toxicological Literature, National Institute of Environmental Health Sciences, Integrated Laboratory Systems, Inc., 32 str.

Harju Mikael, Eldbjørg S. Heimstad, Dorte Herzke, Torkjel Sandanger, Stefan Posner and Frank Wania, 2009, Current State of Knowledge and Monitoring requirements, Emerging “new” Brominated flame retardants in flame retarded products and the environment, SFT Statens forurensningstilsyn, Norwegian pollution control authority,

Harrad, S., Abdallah, M.A.E., Rose, N.L., Turner, S.D., Davidson, T.A., 2009. Current-Use Brominated Flame Betardants in Water, Sediment, and Fish from English Lakes. *Environmental Science & Technology* 43, 9077-9083.

Harrad, S., Ibarra, C., Abdallah, M.A.E., Boon, R., Neels, H., Covaci, A., 2008. Concentrations of brominated flame retardants in dust from United Kingdom cars, homes, and offices: Causes of variability and implications for human exposure. *Environment International* 34, 1170-1175.

He, J.Z., Robrock, K.R., Alvarez-Cohen, L., 2006. Microbial reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Environmental Science & Technology* 40, 4429-4434.

He, M.J., Luo, X.J., Yu, L.H., Liu, J.A., Zhang, X.L., Chen, S.J., Chen, D., Mai, B.X., 2010. Tetrabromobisphenol-A and Hexabromocyclododecane in Birds from an E-Waste Region in South China: Influence of Diet on Diastereoisomer- and Enantiomer-Specific Distribution and Trophodynamics. *Environmental Science & Technology* 44, 5748-5754.

Hermanson, M.H., Isaksson, E., Forsstrom, S., Texeira, C., Muir, D.C.G., Pohjola, V.A., van de Wal, R.S.V., 2010. Deposition History of Brominated Flame Retardant Compounds in an Ice Core from Høltedalsfonna, Svalbard, Norway. *Environmental Science & Technology* 44, 7405-7410.

Hirschler, M.M., Tsika, O., 1983. THE EFFECT OF COMBINATIONS OF ALUMINUM(III) OXIDES AND DECABROMOBIPHENYL ON THE FLAMMABILITY

OF AND SMOKE PRODUCTION FROM ACRYLONITRILE-BUTADIENE-STYRENE TERPOLYMER. *European Polymer Journal* 19, 375-380.

Hites, R.A., 2004. Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: A meta-analysis of concentrations. *Environmental Science & Technology* 38, 945-956.

Hoh, E., Zhu, L.Y., Hites, R.A., 2005. Novel flame retardants, 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane and 2,3,4,5,6-pentabromoethylbenzene, in United States' environmental samples. *Environmental Science & Technology* 39, 2472-2477.

Inoue, K., Harada, K., Takenaka, K., Uehara, S., Kono, M., Shimizu, T., Takasuga, T., Senthilkumar, K., Yamashita, F., Koizumi, A., 2006. Levels and concentration ratios of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in serum and breast milk in Japanese mothers. *Environmental Health Perspectives* 114, 1179-1185.

Karlsson, M., Ericson, I., van Bavel, B., Jensen, J.K., Dam, M., 2006. Levels of brominated flame retardants in Northern Fulmar (*Fulmarus glacialis*) eggs from the Faroe Islands. *Science of the Total Environment* 367, 840-846.

Karlsson, M., Julander, A., van Bavel, B., Hardell, L., 2007. Levels of brominated flame retardants in blood in relation to levels in household air and dust. *Environment International* 33, 62-69.

Kawashiro, Y., Fukata, H., Inoue, M.O., Kubonoya, K., Jotaki, T., Takigami, H., Sakai, S.I., Mori, C., 2008. Perinatal Exposure to Brominated Flame Retardants and Polychlorinated Biphenyls in Japan. *Endocrine Journal* 55, 1071-1084.

Kierkegaard, A., Bjorklund, J., Friden, U., 2004. Identification of the flame retardant decabromodiphenyl ethane in the environment. *Environmental Science & Technology* 38, 3247-3253.

Knudsen, G.A., Jacobs, L.M., Kuester, R.K., Sipes, I.G., 2007. Absorption, distribution, metabolism and excretion of intravenously and orally administered tetrabromobisphenol A 2,3-dibromopropyl ether in male Fischer-344 rats. *Toxicology* 237, 158-167.

Kresinova, Z., Svobodova, K., Cajthaml, T., 2009. Microbial Degradation of Endocrine Disruptors. *Chemicke Listy* 103, 200-207.

Kuramochi, H., Maeda, K., Kawamoto, K., 2004. Measurements of water solubilities and 1-octanol/water partition coefficients and estimations of Henry's Law constants for brominated benzenes. *Journal of Chemical and Engineering Data* 49, 720-724.

Larsson, A., Eriksson, L.A., Andersson, P.L., Ivarson, P., Olsson, P.E., 2006. Identification of the brominated flame retardant 1,2-dibromo-4-(1,2-dibromoethyl) cyclohexane as an androgen agonist. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 7366-7372.

Law, K., Halldorson, T., Danell, R., Stern, G., Gewurtz, S., Alae, M., Marvin, C., Whittle, M., Tomy, G., 2006. Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2177-2186.

- Law, K., Halldorson, T., Danell, R., Stern, G., Gewurtz, S., Alae, M., Marvin, C., Whittle, M., Tomy, G., 2007. Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web. (vol 25, pg 2177, 2006). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 190-190.
- Law, R.J., Allchin, C.R., de Boer, J., Covaci, A., Herzke, D., Lepom, P., Morris, S., Tronczynski, J., de Wit, C.A., 2006b. Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere* 64, 187-208.
- Leskinen, P., Michelini, E., Picard, D., Karp, M., Virta, M., 2005. Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. *Chemosphere* 61, 259-266.
- Li, J., Ma, M., Wang, Z.J., 2010. In vitro profiling of endocrine disrupting effects of phenols. *Toxicology in Vitro* 24, 201-207.
- Linhartová, L., 2010. Biodegradace polychlorovaných bifenylů pomocí ligninolytických hub a jejich enzymů. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Katedra biochemie, 79 str.
- Mardones, C., von Baer, D., Hidalgo, A., Contreras, A., Sepulveda, C., 2008. Determination of pentachlorophenol and tribromophenol in sawdust by ultrasound-assisted extraction and MEKC. *Journal of Separation Science* 31, 1124-1129.
- Möller, A., Xie, Z.Y., Sturm, R., Ebinghaus, R., 2011. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and alternative brominated flame retardants in air and seawater of the European Arctic. *Environmental Pollution* 159, 1577-1583.
- Montie, E.W., Letcher, R.J., Reddy, C.M., Moore, M.J., Rubinstein, B., Hahn, M.E., 2010. Brominated flame retardants and organochlorine contaminants in winter flounder, harp and hooded seals, and North Atlantic right whales from the Northwest Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1160-1169.
- Muenhor, D., Harrad, S., Ali, N., Covaci, A., 2010. Brominated flame retardants (BFRs) in air and dust from electronic waste storage facilities in Thailand. *Environment International* 36, 690-698.
- Muskatell, M., Utevski, L., Shenker, M., Daren, S., Peled, M., Charit, Y., 1997. Flame retardant polypropylene fibers with good dyeability. *Journal of Applied Polymer Science* 64, 601-606.
- Nyholm, J.R., Lundberg, C., Andersson, P.L., 2010. Biodegradation kinetics of selected brominated flame retardants in aerobic and anaerobic soil. *Environmental Pollution* 158, 2235-2240.
- Oberg, K., Warman, K., Oberg, T., 2002. Distribution and levels of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere* 48, 805-809.
- OECD, 1995. RISK REDUCTION MONOGRAPH NO.3: SELECTED BROMINATED FLAME RETARDANTS BACKGROUND AND NATIONAL EXPERIENCE WITH

REDUCING RISK. OECD ENVIRONMENT MONOGRAPH SERIES NO. 102. Paříž 1995, 152 str.

Oliveira, A.S., Silva, V.M., Veloso, M.C.C., Santos, G.V., De Andrade, J.B., 2009. Bromophenol concentrations in fish from Salvador, BA, Brazil. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* 81, 165-172.

Olsen, C.M., Meussen-Elholm, E.T.M., Holme, J.A., Hongslo, J.K., 2002. Brominated phenols: characterization of estrogen-like activity in the human breast cancer cell-line MCF-7. *Toxicology Letters* 129, 55-63.

Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 20-33.

Pullen, S., Boecker, R., Tiegs, G., 2003. The flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrabromobisphenol A-bisallylether suppress the induction of interleukin-2 receptor alpha chain (CD25) in murine splenocytes. *Toxicology* 184, 11-22.

Qiu, X.H., Zhu, T., Hu, J.X., 2010. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and other flame retardants in the atmosphere and water from Taihu Lake, East China. *Chemosphere* 80, 1207-1212.

Rahm, S., Green, N., Norrgran, J., Bergman, A., 2005. Hydrolysis of environmental contaminants as an experimental tool for indication of their persistency. *Environmental Science & Technology* 39, 3128-3133.

Reineke, N., Biselli, S., Franke, S., Francke, W., Heinzl, N., Huhnerfuss, H., Iznaguen, H., Kammann, U., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W., 2006. Brominated indoles and phenols in marine sediment and water extracts from the North and Baltic Seas - Concentrations and effects. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 186-196.

Ronen, Z., Abeliovich, A., 2000. Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2372-2377.

Ricklund, N., Kierkegaard, A., McLachlan, M.S., 2008. An international survey of decabromodiphenyl ethane (deBDEthane) and decabromodiphenyl ether (decaBDE) in sewage sludge samples. *Chemosphere* 73, 1799-1804.

Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 241-248.

Sawal, G., Feibicke, M., Meinecke, S., Warmbrunn-Suckrow, E., Lepom, P., 2008. IDENTIFICATION OF A NOVEL BROMINATED FLAME RETARDANT IN DUST. *Organohalogen Compounds* 70, 2029-2032

Schwarzbauer, J., Ricking, M., Franke, S., Francke, W., 2001. Halogenated organic contaminants in sediments of the Havel and Spree rivers (Germany). Part 5 of organic compounds as contaminants of the Elbe river and its tributaries. *Environmental Science &*

Technology 35, 4015-4025.

Sellstrom, U., Jansson, B., 1995. ANALYSIS OF TETRABROMOBISPHENOL A IN A PRODUCT AND ENVIRONMENTAL-SAMPLES. *Chemosphere* 31, 3085-3092.

Shiizaki, K., Asai, S., Ebata, S., Kawanishi, M., Yagi, T., 2010. Establishment of yeast reporter assay systems to detect ligands of thyroid hormone receptors alpha and beta. *Toxicology in Vitro* 24, 638-644.

Shi, T., Chen, S.J., Luo, X.J., Zhang, X.L., Tang, C.M., Luo, Y., Ma, Y.J., Wu, J.P., Peng, X.Z., Mai, B.X., 2009. Occurrence of brominated flame retardants other than polybrominated diphenyl ethers in environmental and biota samples from southern China. *Chemosphere* 74, 910-916.

Shiizaki, K., Asai, S., Ebata, S., Kawanishi, M., Yagi, T., 2010. Establishment of yeast reporter assay systems to detect ligands of thyroid hormone receptors alpha and beta. *Toxicology in Vitro* 24, 638-644.

Sim, W.J., Lee, S.H., Lee, I.S., Choi, S.D., Oh, J.E., 2009. Distribution and formation of chlorophenols and bromophenols in marine and riverine environments. *Chemosphere* 77, 552-558.

Sjodin, A., Carlsson, H., Thuresson, K., Sjolín, S., Bergman, A., Ostman, C., 2001. Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments. *Environmental Science & Technology* 35, 448-454.

Sjodin, A., Patterson, D.G., Bergman, A., 2003. A review on human exposure to brominated flame retardants - particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environment International* 29, 829-839.

Spiker, J.K., Crawford, D.L., Crawford, R.L., 1992. INFLUENCE OF 2,4,6-TRINITROTOLUENE (TNT) CONCENTRATION ON THE DEGRADATION OF TNT IN EXPLOSIVE-CONTAMINATED SOILS BY THE WHITE ROT FUNGUS PHANEROCHAETE-CHRYSPORIUM. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3199-3202.

Stapleton, H.M., Allen, J.G., Kelly, S.M., Konstantinov, A., Klosterhaus, S., Watkins, D., McClean, M.D., Webster, T.F., 2008. Alternate and new brominated flame retardants detected in US house dust. *Environmental Science & Technology* 42, 6910-6916.

Suzuki, G., Takigami, H., Watanabe, M., Takahashi, S., Nose, K., Asari, M., Sakai, S.I., 2008. Identification of brominated and chlorinated phenols as potential thyroid-disrupting compounds in indoor dusts. *Environmental Science & Technology* 42, 1794-1800.

Svobodova, K., Plackova, M., Novotna, V., Cajthaml, T., 2009. Estrogenic and androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two in vitro yeast assays. *Science of the Total Environment* 407, 5921-5925.

Szymanska, J.A., Piotrowski, J.K., 2000. Hepatotoxicity of monobromobenzene and hexabromobenzene: effects of repeated dosage in rats. *Chemosphere* 41, 1689-1696.

- Takigami, H., Suzuki, G., Hirai, Y., Sakai, S., 2009. Brominated flame retardants and other polyhalogenated compounds in indoor air and dust from two houses in Japan. *Chemosphere* 76, 270-277.
- Thomsen, C., Leknes, H., Lundanes, E., Becher, G., 2001. Brominated flame retardants in laboratory air. *Journal of Chromatography A* 923, 299-304.
- Thomsen, C., Lundanes, E., Becher, G., 2001b. Brominated flame retardants in plasma samples from three different occupational groups in Norway. *Journal of Environmental Monitoring* 3, 366-370.
- Tice, R., 1999, Tetrabromophthalic Anhydride [CASRN 632-79-1], Review of Toxicological Literature, Integrated Laboratory Systems, Inc.
- Tomy, G.T., Palace, V.P., Pleskach, K., Ismail, N., Oswald, T., Danell, R., Wautier, K., Evans, B., 2007. Dietary exposure of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane: Bioaccumulation parameters, biochemical effects, and metabolism. *Environmental Science & Technology* 41, 4913-4918.
- Uhnakova, B., Petrickova, A., Biedermann, D., Homolka, L., Vejvoda, V., Bednar, P., Papouskova, B., Sulc, M., Martinkova, L., 2009. Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 76, 826-832.
- Van der Ven, L.T.M., de Kuil, T.V., Verhoef, A., Verwer, C.M., Lilienthal, H., Leonards, P.E.G., Schauer, U.M.D., Canton, R.F., Litens, S., De Jong, F.H., Visser, T.J., Dekant, W., Stern, N., Hakansson, H., Slob, W., Van den Berg, M., Vos, J.G., Piersma, A.H., 2008. Endocrine effects of tetrabromobisphenol-A (TBBPA) in Wistar rats as tested in a one-generation reproduction study and a subacute toxicity study. *Toxicology* 245, 76-89.
- Venier, M., Wierda, M., Bowerman, W.W., Hites, R.A., 2010. Flame retardants and organochlorine pollutants in bald eagle plasma from the Great Lakes region. *Chemosphere* 80, 1234-1240.
- Verreault, J., Gebbink, W.A., Gauthier, L.T., Gabrielsen, G.W., Letcher, R.J., 2007. Brominated flame retardants in glaucous gulls from the Norwegian Arctic: More than just an issue of polybrominated diphenyl ethers. *Environmental Science & Technology* 41, 4925-4931.
- Vetter, W., von der Recke, R., Herzke, D., Nygard, T., 2008. Detailed analysis of polybrominated biphenyl congeners in bird eggs from Norway. *Environmental Pollution* 156, 1204-1210.
- Viberg, H., Fredriksson, A., Eriksson, P., 2004. Neonatal exposure to the brominated flame-retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether, decreases cholinergic nicotinic receptors in hippocampus and affects spontaneous behaviour in the adult mouse. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 17, 61-65.
- von der Recke, R., Vetter, W., 2007. Synthesis and characterization of 2,3-dibromopropyl-2,4,6-tribromophenyl ether (DPTE) and structurally related compounds evidenced in seal blubber and brain. *Environmental Science & Technology* 41, 1590-1595.

Voordeckers, J.W., Fennell, D.E., Jones, K., Haggbloom, M.M., 2002. Anaerobic biotransformation of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and bisphenol A in estuarine sediments. *Environmental Science & Technology* 36, 696-701.

Watanabe, I., Kashimoto, T., Tatsukawa, R., 1983. IDENTIFICATION OF THE FLAME-RETARDANT TETRABROMOBISPHENOL-A IN THE RIVER SEDIMENT AND THE MUSSEL COLLECTED IN OSAKA. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 48-52.

Whitfield, F.B., Helidoniotis, F., Svoronos, D., Shaw, K.J., Ford, G.L., 1995. THE SOURCE OF BROMOPHENOLS IN SOME SPECIES OF AUSTRALIAN OCEAN FISH. *Water Science and Technology* 31, 113-120.

Whitfield, F.B., Shaw, K.J., Walker, D.I., 1992. THE SOURCE OF 2,6-DIBROMOPHENOL - CAUSE OF AN IODOFORM TAIN IN AUSTRALIAN PRAWNS. *Water Science and Technology* 25, 131-138.

WHO, 1994. Polybrominated biphenyls. *Environmental health criteria* 152. Geneva.

WHO, 1995. Tetrabromobisphenol A and derivatives. *Environmental health criteria* 172. Geneva.

WHO, 1997. Flame retardants: a general introduction. *Environmental health criteria* 192. Geneva.

Wilkins, J.P.G., Yorke, C.P., Tinkler, M.R., 1997. Investigating the use of deuteriodiazomethane derivatization for enhancing trace gas chromatography mass spectrometry determination of halophenols in the presence of haloanisoles? *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11, 206-208.

Wu, J.P., Guan, Y.T., Zhang, Y., Luo, X.J., Zhi, H., Chen, S.J., Mai, B.X., 2010. Trophodynamics of Hexabromocyclododecanes and Several Other Non-PBDE Brominated Flame Retardants in a Freshwater Food Web. *Environmental Science & Technology* 44, 5490-5495.

Wu, J.P., Guan, Y.T., Zhang, Y., Luo, X.J., Zhi, H., Chen, S.J., Mai, B.X., 2011. Several current-use, non-PBDE brominated flame retardants are highly bioaccumulative: Evidence from field determined bioaccumulation factors. *Environment International* 37, 210-215.

Zhou, T., Ross, D.G., DeVito, M.J., Crofton, K.M., 2001. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicological Sciences* 61, 76-82.

Zhu, L.Y., Ma, B.L., Hites, R.A., 2009. Brominated Flame Retardants in Serum from the General Population in Northern China. *Environmental Science & Technology* 43, 6963-6968.

SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2003/11/ES, ze dne 6. února 2003, kterou se po dvacáté čtvrté mění směrnice Rady 76/769/EHS týkající se omezení uvádění na trh a používání některých nebezpečných látek a přípravků (pentabromdifenylether, oktabromdifenylether)

SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2002/96/ES, ze dne 27. ledna 2003, o odpadních elektrických a elektronických zařízeních (OEEZ)

SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2002/95/ES, ze dne 27. ledna 2003, o omezení používání některých nebezpečných látek v elektrických a elektronických zařízeních

ROZHODNUTÍ KOMISE 2005/717/ES, ze dne 13. října 2005, kterým se pro účely přizpůsobení technickému pokroku mění příloha směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/95/ES o omezení používání některých nebezpečných látek v elektrických a elektronických zařízeních

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY č. 1907/2006, ze dne 18. prosince 2006, o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES

7/2005 Sb., Zákon ze dne 16. prosince 2004, kterým se mění zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů

185/2001 Sb., Zákon o odpadech a o změně některých dalších zákonů